

**ESTUDIOS FUNCIONALES RELACIONADOS A LA
PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE LÍPIDOS StarD7:
EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE StarD7 SOBRE LA EXPRESIÓN Y
FUNCIÓN DE CONEXINA 43**

**TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS DE**

MARIANO MATÍAS ARZUD CRUZ DEL PUERTO

Director de Tesis: Dra. Susana Genti-Raimondi



Departamento de Bioquímica Clínica

CIBICI – CONICET

Facultad de Ciencias Químicas

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, 2021

Comisión Asesora de Tesis

Dra. Marta Hallak

Dra. Graciela Panzetta de Dutari

Dra. Carolina Touz

Comisión Evaluadora de Tesis

Dra. Marta Hallak

Dra. Graciela Panzetta de Dutari

Dra. Carolina Touz

Dr. Alicia Damiano

AGRADECIMIENTOS

Antes que todo me gustaría agradecer a CONICET y a la Universidad pública por la posibilidad de seguir mi formación científica y profesional. Sin dudas la educación es el camino para que podamos soñar con un país y una sociedad mejor.

Agradecer a todas las personas que fueron parte del proceso de esta tesis:

A la Dra. Genti, la directora de esta tesis, por la posibilidad de desarrollar esta tesis y asumir el compromiso de ser parte de mi formación. Gracias por transmitirme su pasión por la ciencia.

A la Dra. Panzetta, por estar siempre predispuesta a aportar su opinión para mejorar o solucionar inconvenientes experimentales.

A Jesi, muchas gracias por ayudarme a adaptarme en el laboratorio y tu paciencia para enseñarme todas las técnicas. Gracias por ayudarme cuando ya no estabas en el laboratorio.

Lucy R., por ser siempre una fuente de consulta y ayuda en el laboratorio. Por la crema y los caramelitos que sobraban del cumpleaños de Felipe.

Lau, por tu ayuda y paciencia. Sobre todo por tantas risas y catarsis en todos estos años.

Andre, por esa energía positiva constante aunque era un sábado a la tarde y estábamos renegando con los clonados en el lab.

Lucille, por estar siempre para ayudar.

Ana Racca, por la ayuda en los experimentos.

A todo el grupo Genti –GPAN, por el buen ambiente de trabajo que generamos en la mesada y la amistad que tenemos fuera del laboratorio.

A todo el laboratorio 119-120, sus investigadores e investigadoras por sus aportes en los seminarios de los viernes en los que aprendí mucho y fueron muy importantes para mi formación.

A los becarios y becarias que pasaron desde 2014 hasta hoy, por ayudarme a integrar al laboratorio y por compartir muchos momentos en el día a día del laboratorio y fuera del laboratorio.

A las amistades que me quedan de estos años en el laboratorio:

Nubia, mi amiga colombiana, gracias por compartir tantos momentos y escucharme.

Luci S., gracias por siempre estar atenta para ayudar y por las charlas en la U.

Cristian F., por tanta alegría en esos primeros años de doctorado.

Danilo, por tantos momentos compartidos.

Colo, por esos buenos momentos de pasantía.

A la “mesa chica”, Nico R., Pablo, Mariano, Juan Cruz y Chicho, por tantos asados compartidos y por los retiros que renovaban la energía.

A mis amistades de otros laboratorios del CIBICI: Ro, Fer Suarez, Jannett, Lili y Lau A.

Al grupo Cell COM de A Coruña, Dra. Mayan, gracias por responder a mi correo y abrir las puertas de su laboratorio para que haya podido tener esa experiencia. A las amistades que conservo de esos 90 días en España: Pau, Adri, Amanda, Rocío y Andrés gracias por hacerme sentir como en casa. A mis compañeros de departamento, Danae y Kobby, por el intercambio cultural que me ayuda a seguir creciendo.

A mis amigos/as que siguen presente a pesar de los años:

Mari, Ale, Negrah, Negro, Juana, Pepo, Cristian y Jose.

Mis amigos/as de Jujuy.

A todas las personas que forman parte del CIBICI- Departamento de Bioquímica clínica de la FCQ-UNC, por su ayuda siempre que lo necesite y por generar un ambiente cálido para transitar estos años. Sin dudas el CIBICI seguirá creciendo por la calidad humana y profesional que son necesarios para que una institución sea grande.

Mis padres, Elena e Isidoro por apoyar mi formación y ser mi ejemplo de esfuerzo y dedicación para lograr los objetivos.

Mi hermana Vani y mi hermano Nico, por seguir estando cerca mío para aconsejarme y escucharme en distintos momentos.

Mi sobrina y ahijada Pía, por ser solo alegría.

A mi Novia, Alien, por ser mi apoyo constante y estar en los buenos y malos momentos.

**A mi familia y amistades que
siempre me acompañan.**

**A la memoria de Mario y
Oscar, mis padrinos.**

"Los países ricos lo son porque dedican dinero al desarrollo científico - tecnológico, y los países pobres lo siguen siendo porque no lo hacen.
La ciencia no es cara, cara es la ignorancia."

Bernardo Houssay

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| ABREVIATURAS | 1 |
| RESUMEN | 4 |
| ABSTRACT | 6 |
| INTRODUCCIÓN | 8 |
| 1 .La familia de las proteínas START | 9 |
| 2. La proteína transportadora de lípidos StarD7 | 11 |
| 2.1. Características estructurales y bioquímicas | 12 |
| 2.2. Expresión y regulación de StarD7 | 15 |
| 2.3. Impacto de la disminución de StarD7 a nivel celular y molecular | 18 |
| 3. Comunicación celular | 23 |
| 3.1. La familia de las conexinas | 25 |
| 3.2. Ciclo de vida de las conexinas | 25 |
| 3.3. Conexina 43 | 27 |
| 3.4. Función no canónica de conexina 43 o independiente de la función canal | 29 |
| 3.5. El interactoma del extremo C-terminal de conexina 43 | 30 |
| 3.6. Participación de conexina 43 en la migración celular | 32 |
| 4. Organelas y proteínas involucradas en la migración celular | 33 |
| 4.1. Aparato de Golgi y centro organizador de microtúbulos (MTOC) | 33 |
| 4.2. Contribución del factor de transcripción Twist1 a la migración celular | 36 |
| 5. Las células placentales como modelo de estudio | 38 |
| 5.1. Construcción de la hipótesis de trabajo | 39 |
| OBJETIVOS | 40 |
| RESULTADOS | 42 |
| I. Efecto del silenciamiento de StarD7 sobre la expresión de conexina 43 | 43 |
| La disminución de StarD7 reduce la expresión de conexina 43 | 43 |
| II. Efecto del silenciamiento de StarD7 sobre la expresión de proteínas de matriz extracelular (ECM) y asociadas a éstas | 46 |
| La disminución de StarD7 en células HTR-8/SVneo incrementa los niveles de transcritos y de proteínas de ECM y de proteínas asociadas a ECM | 46 |
| La disminución de StarD7 en células HTR-8/SVneo conduce a un aumento en la actividad de la metaloproteasa 9 | 48 |
| III. Efecto del silenciamiento de StarD7 sobre la adhesión y migración celular polarizada | 50 |
| El silenciamiento de StarD7 disminuye la adhesión de las células HTR-8/SVneo a fibronectina | 50 |
| El silenciamiento de StarD7 disminuye la migración celular polarizada en las células HTR-8/SVneo | 51 |

| | |
|--|----|
| El silenciamiento de StarD7 produce una disminución en los niveles de Twist1 | 52 |
| IV. Efecto del silenciamiento de StarD7 sobre la morfología del aparato de Golgi y la localización del centro organizador de microtúbulos (MTOC) | 54 |
| La disminución de StarD7 en células HTR8/ SVneo produce disrupción del aparato de Golgi | 54 |
| El silenciamiento de StarD7 en las células HTR-8/SVneo no modifica la integridad de la red de las fibras de actina | 55 |
| El silenciamiento de StarD7 en las células HTR-8/SVneo altera la localización del MTOC | 56 |
| V. Efecto de la recuperación de los niveles de StarD7 o conexina 43 en las células silenciadas | 59 |
| La expresión exógena de StarD7 en células HTR-8/SVneo silenciadas restaura los niveles de conexina 43 y nidogen-1 | 59 |
| La expresión exógena de conexina 43 en células HTR-8/SVneo silenciadas restaura los niveles de nidogen-1 | 60 |
| La expresión exógena de conexina 43 en células HTR-8/SVneo silenciadas restablece la migración polarizada | 61 |
| DISCUSIÓN | 63 |
| I. Efecto del silenciamiento de StarD7 sobre la expresión proteica de conexina43 en la célula trofoblástica HTR-8/SVneo | 64 |
| II. Efecto del silenciamiento de StarD7 sobre la expresión de proteínas de matriz extracelular (ECM) y asociadas a éstas | 66 |
| III. Efecto del silenciamiento de StarD7 sobre la adhesión y migración celular polarizada | 70 |
| IV. Efecto del silenciamiento de StarD7 sobre la morfología del aparato de Golgi y la localización del centro organizador de microtúbulos (MTOC) | 73 |
| V. Efecto de la recuperación de los niveles de StarD7 o conexina 43 en las células silenciadas | 75 |
| ANEXO I | 78 |
| Cuantificación de StarD7 en condrocitos de pacientes con osteoartritis | 79 |
| La expresión de StarD7 está disminuida en los condrocitos de pacientes con osteoartritis | 80 |
| Los condrocitos de pacientes con osteoartritis tienen alterada la estructura mitocondrial y aumentados los niveles de Mfn2 | 82 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 84 |
| MÉTODOS DE BIOLOGÍA CELULAR | 85 |

| | |
|--|-----|
| Cultivo de líneas celulares eucariotas | 85 |
| Cultivo primario de condrocitos humanos | 85 |
| Silenciamiento de la expresión de StarD7 | 86 |
| Ensayo de reparación de la herida (wound healing) | 87 |
| Ensayo de adhesión celular sobre superficie de fibronectina | 88 |
| Generación de partículas virales que expresan StarD7.I | 88 |
| Ensayo de recuperación de los niveles de StarD7.I | 89 |
| Ensayo de recuperación de los niveles de Cx43 | 90 |
| MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR | 90 |
| Construcción de plásmidos | 90 |
| Preparación de bacterias competentes | 91 |
| Preparación de bacterias electrocompetentes | 91 |
| Transformación de bacterias por electroporación | 92 |
| Preparación de bacterias competentes químicas | 92 |
| Transformación de bacterias competentes químicas | 93 |
| Purificación de plásmidos | 94 |
| Purificación de ARN total de células eucariotas | 94 |
| Reacción de transcriptasa reversa | 95 |
| Semi-cuantificación del ADNc mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 95 |
| Amplificación de ADNc cuantitativa por reacción en cadena de polimerasa a tiempo real (qPCR) | 96 |
| MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS | 96 |
| Detección inmunológica de proteínas transferidas a soporte sólido | 96 |
| Western blot | 96 |
| Inmunofluorescencia | 97 |
| Tinción de las mitocondrias con MitoTracker Deep Red | 98 |
| Zimografía | 99 |
| ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS | 100 |
| ANEXO II | 101 |
| BIBLIOGRAFÍA | 104 |

ABREVIATURAS

- ABCG2:** Cassette de unión a ATP subfamilia G miembro 2 (*ATP binding cassette subfamily G member 2*)
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- ARN:** Ácido ribonucleico
- ARNm:** ARN mensajero
- CT:** Dominio C-terminal
- CTB:** Citotrofoblastos
- Cx43:** Conexina 43
- Cxs:** Conexinas
- DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- ECM:** Matriz Extracelular (*Extracellular matrix*)
- Gaps:** Uniones comunicantes
- GJA1:** Proteína de unión de huesos alfa 1 (*Gap Junction Protein Alpha 1*)
- GJIC:** Comunicación intercelular de uniones de brecha (*Gap Junctional Intercellular Communication*)
- GM130:** Proteína de matriz de Golgi 130
- GTT1:** Tumor trofoblástico gestacional 1 (*Gestational Trophoblastic Tumour 1*)
- HBP:** Vía biosintética de la Hexosamina (*Hexosamine Biosynthetic Pathway*)
- IM:** Membrana interna mitocondrial
- ITGA1:** Integrina α 1
- ITGA5:** Integrina α 5
- ITGB1:** Integrina β 1
- KDa:** Kilo Dalton
- KO:** Eliminado (*Knockout*)
- LTPs:** Proteínas transportadoras de lípidos
- MMP:** Metaloproteasa

MTOC: Centro organizador de microtúbulos

NID1: Nidogen-1

OA: Osteoartritis

ODDD: Displasia oculo-dento-digital

PARL: Presenilinas asociada a proteína romboide (*Presenilins-associated rhomboid-like protein*)

PC: Fosfatidilcolina

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

qRT-PCR: PCR cuantitativa en tiempo real

RE: Retículo endoplásmico

ROS: Especies reactivas del oxígeno

SF-1: Factor esteroideogénico 1 (*Steroidogenic factor 1*)

SFB: Suero fetal bovino

STB: Sinciciotrofoblastos

siC: siRNA inespecífico (*siRNA Scrambled*)

siD7: siRNA dirigido contra la secuencia del ARN mensajero de StarD7

siRNA: Pequeño ARN de interferencia (*Small interfering RNA*)

StarD7: Proteína StarD7 con dominio START (*StAR-related lipid transfer (START) domain containing 7*)

START: Proteína reguladora esteroideogénica aguda relacionada a la transferencia de lípidos (*Steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer*)

TCF4: Factor de transcripción 4 específico de células T (*T Cell-specific transcription factor 4*)

TGN: Trans Golgi network

TIM23: Translocasa de la membrana interna mitocondrial

TOM: Translocasa de la membrana externa mitocondrial

TNT: Túneles de nanotubos (*tunneling nanotubes*)

Twist1: *Twist homolog 1*

UPR: Respuesta a las proteínas no plegadas (*Unfolded Protein Response*)

ZO-1: *Zonula occludens 1*

RESUMEN

La proteína transportadora de lípidos StarD7 pertenece a la superfamilia de proteínas con dominio START. La expresión evolutivamente conservada de estas proteínas en distintas especies resalta su importancia en el transporte, metabolismo y señalamiento intracelular lipídico. Está ampliamente demostrada la contribución de StarD7 en el mantenimiento de la homeostasis celular, participando en el transporte de fosfatidilcolina (PC) a la mitocondria, esencial para preservar la morfología y función mitocondrial. Además, el déficit de StarD7 se ha asociado a estrés de retículo endoplásmico y alteraciones en la proliferación y migración celular.

En este trabajo de tesis se analizó la contribución de StarD7 sobre la expresión de conexina 43 (Cx43) y su participación en la migración celular polarizada usando como modelo de estudio la línea celular derivada de trofoblasto extravelloso HTR-8/SVneo, la cual exhibe un marcado fenotipo migratorio e invasivo.

Se demostró que el silenciamiento de StarD7 conduce a una disminución del ARNm de Cx43 que se correlaciona con niveles disminuidos de su proteína. La disminución en los niveles de la proteína Cx43 se asoció a un aumento en los niveles de los transcritos ITGA1, ITGA5, ITGB1 y NID1 así como en los niveles proteicos de integrina α 1, integrina α 5, integrina β 1 madura, β -catenina y nidogen-1 y en la actividad de MMP9.

Por otro lado, se demostró que el silenciamiento de StarD7 conduce a una disminución en la migración polarizada de las células HTR-8/SVneo con una reducción en los niveles proteicos de Twist1. Además, se detectó que las células con StarD7 silenciado tienen menor afinidad de adhesión sobre una superficie de fibronectina.

Se estableció mediante ensayos de inmunofluorescencia que el silenciamiento de StarD7 conduce a una disrupción del aparato de Golgi y alteración en la localización del centro organizador de microtúbulos (MTOC) durante la migración polarizada. Mediante ensayos de recuperación se determinó que los niveles de Cx43 son dependientes de los niveles de expresión de StarD7. La recuperación de Cx43 en las células silenciadas contra StarD7 sugiere que los niveles de nidogen-1 son dependientes de la abundancia de la proteína Cx43 y que su recuperación permitiría restablecer la migración celular polarizada.

En resumen, los hallazgos de este trabajo de tesis indican que la disminución en la expresión de Cx43 inducida por la disminución de la proteína transportadora de PC StarD7 tiene un impacto significativo en la expresión y/o función de otras proteínas. Además, se demostró que el silenciamiento de StarD7 conduce a alteración en la morfología del aparato de Golgi y en la localización del MTOC contribuyendo a una desregulación en la homeostasis celular.

Finalmente, es importante destacar que las Cxs desempeñan un papel esencial en el desarrollo y la función del sistema reproductivo femenino de los mamíferos. Por lo tanto, los resultados de este trabajo de tesis resaltan la importancia de explorar el rol de StarD7 en patologías placentales.

ABSTRACT

The StarD7 lipid transporter protein belongs to the START-domain protein superfamily. The evolutionarily preserved expression of these proteins in different species highlights their importance in lipid intracellular transport, metabolism and signaling. It is widely demonstrated the contribution of StarD7 to maintain cellular homeostasis, participating in the transport of phosphatidylcholine (PC) to the mitochondria, essential for mitochondrial function and morphogenesis. In addition, StarD7 deficiency has been associated with endoplasmic reticulum stress as well as with alterations in cell proliferation and migration.

This thesis work analyzed StarD7's contribution to the connexin 43 (Cx43) expression and its participation in polarized cell migration using as a study model the cell line derived from HTR-8/SVneo extravillous trophoblast, which exhibits a marked migratory and invasive phenotype.

It was shown that StarD7 silencing leads to a decrease in Cx43 mRNA that correlates with decreased levels of the Cx43 protein. The decrease in the Cx43 protein levels was associated with an increase in the levels of ITGA1, ITGA5, ITGB1 and NID1 transcripts as well as with the protein levels of integrin α 1, integrin α 5, mature integrin β 1, β -catenin, and nidogen-1, and in MMP9 activity.

On the other hand, it was shown that StarD7 silencing leads to a decrease in polarized cell migration of HTR-8/SVneo cells with a decrease Twist1 protein levels. In addition, cells with silenced StarD7 were found to have lower adhesion affinity on a fibronectin surface.

It was established by immunofluorescence assays that StarD7 silencing leads to a disruption of the Golgi apparatus and alteration in the location of the microtubule organizing center (MTOC) during polarized migration. Recovery assays determined that Cx43 levels are dependent on StarD7 expression levels. Cx43 recovery experiments on StarD7-silenced cells suggest that nidogen-1 levels are dependent on the abundance of the Cx43 protein and that its recovery would restore the polarized cell migration.

In summary, the findings of this thesis work indicate that the decrease in the expression of Cx43 induced by the decrease of the PC transfer protein StarD7 has a significant impact on the expression and/or function of other proteins. Additionally,

StarD7 silencing leads to alteration on the morphology of Golgi apparatus and also to the location of MTOC contributing to deregulation in cellular homeostasis.

Finally, it is important to note that Cxs play an essential role in the development and in the function of the female reproductive system of mammals. Therefore, the results of this thesis work highlight the importance of exploring StarD7's role in placental pathologies.

INTRODUCCIÓN

1. La familia de las proteínas START

Las células eucariotas poseen una gran diversidad de lípidos que se caracterizan por su baja solubilidad en agua. Los principales lípidos son los glicerolípidos, esfingolípidos y esteroides. En organismos complejos, los lípidos ejercen múltiples funciones tales como ser fuentes de energía o mediadores hormonales. A nivel celular, los lípidos son los componentes estructurales de las membranas determinando la identidad de los compartimientos celulares. Se distribuyen entre las membranas celulares por transporte vesicular y no vesicular. Solo una pequeña minoría de los lípidos alcanza su distribución intracelular final a través de transporte vesicular, mientras que la mayor cantidad del tráfico de lípidos es mediado por proteínas de transferencia de lípidos (LTPs), las cuales transportan el lípido uniéndolo a cavidades hidrofóbicas (Wong et al., 2019).

Las proteínas de la familia START (*steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer*) son LTPs intracelulares involucradas en el transporte no vesicular de lípidos. En los humanos se han descrito 15 diferentes proteínas con dominio START. Este dominio es siempre único y se localiza en el carboxilo terminal de las proteínas StAR. El dominio START comprende 210 aminoácidos que forman una cavidad hidrofóbica (Clark, 2020) la cual une una sola molécula de lípido que es transportada desde una membrana donora a una membrana aceptora. El dominio START además de transportar lípidos puede también sensarlos. Las proteínas con dominio START tienen diversa especificidad de lípidos y localización subcelular (Figura 1). Basado en su homología de secuencia, estas proteínas han sido agrupadas en 6 subfamilias, que comparten el dominio START formado por un plegamiento “hélix-grip” con 9 hojas β antiparalelas unidas a 2 hélices alfa (alfa 1 y alfa 4). Dos “loops” (U1 y U2) se insertan entre las hojas $\beta 5/\beta 6$ y $\beta 7/\beta 8$, respectivamente. Se ha descrito la estructura tridimensional de 8 de ellas (StarD1, D2, D3, D4, D5, D11, D13 y D14). Solo las proteínas StarD2 y StarD11 han sido cristalizadas asociadas a una molécula de fosfatidilcolina (PC) y ceramida, respectivamente (Roderick et al., 2002; Thorsell et al., 2011).

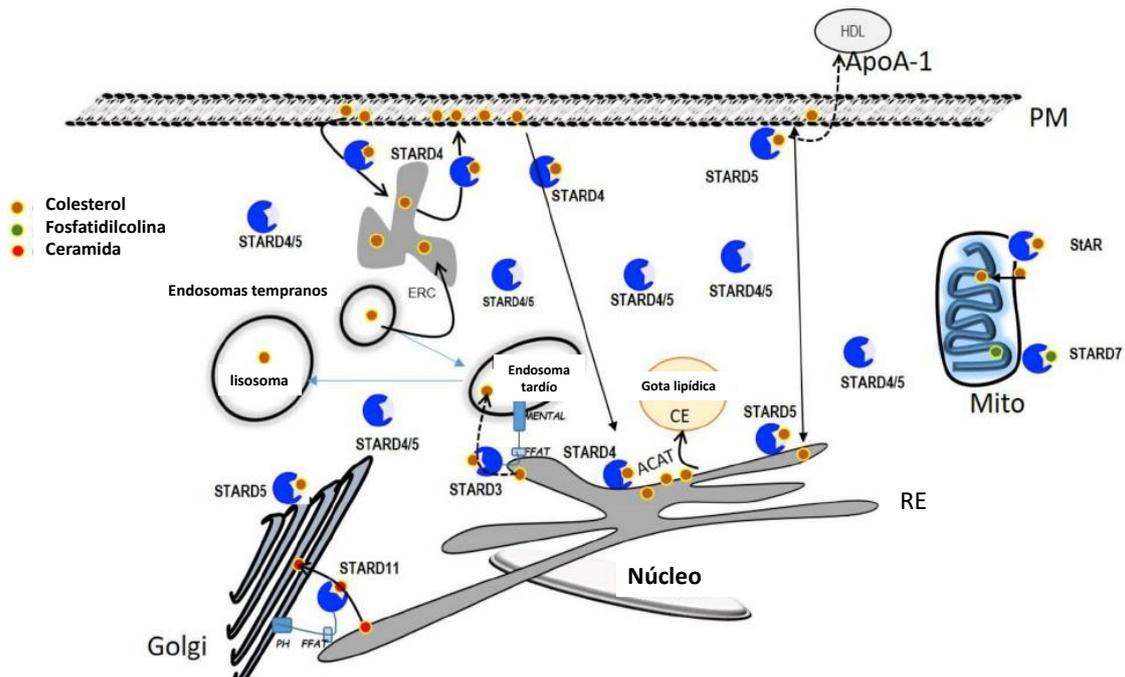


Figura 1. Tráfico no-vesicular de lípidos mediado por proteínas con dominio START. Los ligandos unidos a las proteínas START se muestran en naranja (colesterol), verde (fosfatidilcolina) y rojo (ceramida). StAR se ubica en la membrana externa de la mitocondria, aunque la proteína es importada y procesada en la mitocondria. Se muestra la asociación de STARD4 con Acetil-CoA Acetiltransferasa (ACAT) y con la homeostasis de colesterol esterificado (CE) en el compartimento de reciclado de endosomas (ERC). El tráfico no vesicular de colesterol desde el retículo endoplásmico (RE) a la membrana plasmática (PM) es mediado por STARD4 y STARD5. Se muestra la potencial participación de STARD5 en el eflujo de colesterol a ApoA-1, componente de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), involucradas en el tráfico reverse de colesterol al hígado. STARD3 se muestra como un puente entre los endosomas tardíos y el RE. STARD7 se localiza en la mitocondria y transfiere fosfatidilcolina a la membrana interna y STARD11 transfiere ceramida entre el Golgi y el RE. Adaptada de Clark, 2020, (Clark, 2020).

La participación de las proteínas START en una variedad de procesos fisiológicos, como la transferencia de lípidos entre compartimientos intracelulares, el metabolismo lipídico y la modulación de eventos de señalización, sugiere que la mutación o la expresión desregulada de algunas de estas proteínas generarían procesos patológicos, incluyendo trastornos genéticos, enfermedades autoinmunes, enfermedades de la médula espinal y cáncer (Alpy and Tomasetto, 2014).

2. La proteína transportadora de lípidos StarD7

La proteína transportadora de lípidos StarD7 pertenece al grupo 3 de la familia de las proteínas START junto a StarD2, StarD10 y StarD11 (Figura 2). Genes ortólogos a StarD7 humano se han anotado en las bases de datos GenBank y Ensembl en diferentes genomas, lo que sugiere una función fisiológica conservada. La proteína StarD7 ha sido predicha en la mayoría de los filos animales, vertebrados e invertebrados, así como en plantas, lo que señala su importancia funcional (Flores-Martin et al., 2013).

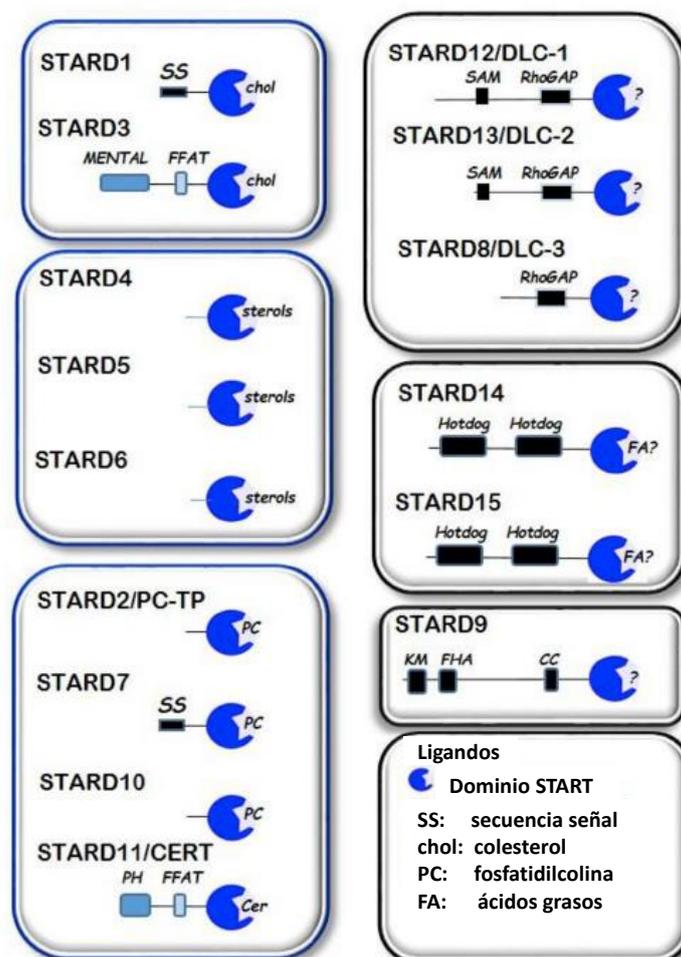


Figura 2. La familia de las proteínas con dominio START en *Homo sapiens*. La alineación de las secuencias de las proteínas START humanas permite subdividir esta familia en 6 subfamilias. SS, secuencia señal; MENTAL, dominio N-terminal de MLN64. PH, homología a “pleckstrin”; FFAT, motivo de dos fenilalaninas en un contexto de aminoácidos con capacidad de asociarse al retículo endoplásmico; RHOGAP, dominio activador de Rho-prenilado; SAM, motivo alfa estéril; Hotdog, dominio conservado para la familia acil-CoA tioesterasa; FHA, dominio de unión asociado al fosfopéptido; KM, dominio motor kinesina. Adaptada de Clark., 2020, (Clark, 2020).

2.1. Características estructurales y bioquímicas

StarD7 es una proteína de expresión ubicua y evolutivamente conservada presente en organismos simples como *Caenorhabditis elegans* hasta organismos tan complejos como los seres humanos. En humanos, el gen de StarD7 posee 8 exones que abarcan 23,96 kb y se localiza en el brazo corto del cromosoma 2p12-2p11.2 (Figura 3). El ARNm de StarD7 (designado originalmente como GTT1, número de acceso a GenBank AF270647.1) se identificó en nuestro laboratorio por técnicas de expresión diferencial de genes. Este ARNm codifica una proteína de 295 aminoácidos (número de acceso AAF81750.1) con un peso molecular de aproximadamente 34,7 kDa (Durand et al., 2004). Nuestro grupo de investigación reportó por primera vez la presencia de la proteína StarD7 en las células del trofoblasto humano, como una proteína de aproximadamente 34 kDa (Angeletti et al., 2008). También fue detectada por espectrometría de masa y análisis de inmunotransferencia en tejido testicular como una proteína de 35 kDa (Leman et al., 2009). Posteriormente, la actualización de la base de datos GenBank indica que el ARNm de StarD7 (NM_020151.3) codifica a una proteína de 370 aminoácidos con un peso teórico de 43.1 kDa y una señal de localización mitocondrial. Mediante captura por afinidad y espectrometría de masa se establecieron dos sitios de ubiquitinación en las lisinas 137 y 339 de StarD7 (NP_064536.2)(Kim et al., 2011). Además, se predicen tres sitios potenciales de fosforilación en las serinas 52, 53 y 350 (Hornbeck et al., 2012). Mediante el uso de una librería de péptidos se predijo que podría ser blanco de una proteína quinasa A (PKA), sugiriendo que StarD7 es una fosfoproteína regulada por la vía cAMP/PKA (Rodríguez et al., 2004).

Varios estudios han demostrado que StarD7 interactúa, une, y transporta moléculas de lípidos. Inicialmente Angeletti y col. reportaron que StarD7 es una proteína que forma monocapas estables por adsorción en la interfase aire-buffer (Angeletti et al., 2004). Posteriormente se demostró que StarD7 recombinante acelera el “*dequenching* de fluorescencia” de vesículas unilamelares así como la formación de células gigantes multinucleares (Angeletti et al., 2012). Haberkant y col. demostraron, mediante ensayos de interacción *in vivo* con lípidos fotoactivables, que StarD7 solo interactuaría con PC (Haberkant et al., 2013). Mediante experimentos de mutagénesis

y marcado de fotoafinidad se demostró que el dominio START de StarD7 posee un sitio de unión común para PC y ceramida, con una fuerte actividad de transferencia de PC *in vitro* la cual es afectada por ceramida (Bockelmann et al., 2018).

Horibata y col., utilizando extractos proteicos preparados a partir de células transfectadas con un vector de expresión que codifica a la proteína de 370 aa observaron, mediante ensayos de Western blot, dos proteínas con pesos moleculares de 43 kDa (StarD7.I) y 33 kDa (StarD7.II) (Horibata and Sugimoto, 2010). Estos autores propusieron que StarD7 se sintetiza como una proteína precursora de 43 kDa que se procesa, por escisión de la secuencia mitocondrial, a una forma madura de aproximadamente 33 kDa, facilitando el transporte de PC a la mitocondria.

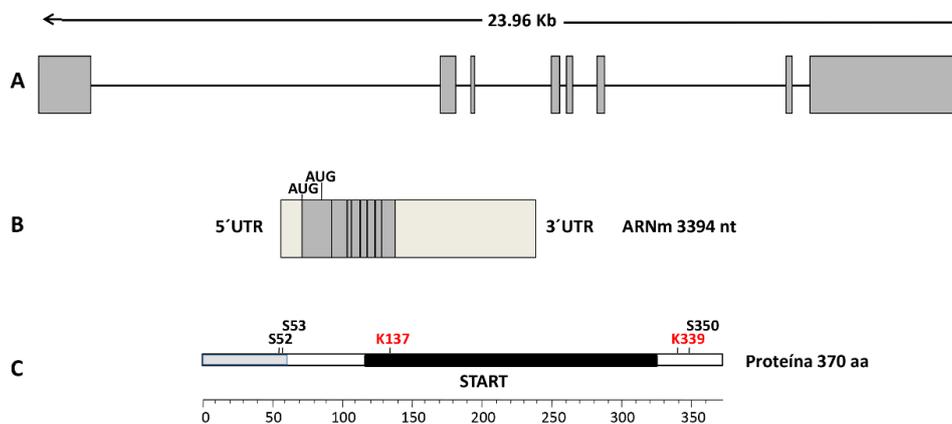


Figura 3. Representación esquemática del gen, del ARNm, y la proteína StarD7 humana. A) La representación lineal muestra la posición relativa y el tamaño aproximado de los ocho exones que abarcan 23,96 kb en el cromosoma 2. **B)** Esquema del ARNm (NM_020151.3) indicando los codones putativos de iniciación de la traducción AUG, que codifican a StarD7.I de 370 aa (posiciones 402-1514) y StarD7.II de 295 aa (posiciones 627-1514). Las regiones grises claras representan las regiones 5'UTR y 3'UTR. **C)** Se indica la proteína StarD7-I (370 aa), con los putativos sitios de ubiquitinación (rojo) y de fosforilación (negro), así como la señal de localización mitocondrial (rectángulo gris) y el dominio START (negro). Adaptada de Flores-Martin et al., 2013, (Flores-Martin et al., 2013).

Recientemente, se demostró que StarD7 contiene en la región carboxilo terminal de la secuencia de localización mitocondrial un segmento transmembrana. Además se reportó que la forma precursora de StarD7 se cliva entre la metionina 76 y la alanina 77 y entre la alanina 77 y la alanina 78 para producir la forma madura, sugiriendo que StarD7 se ancla en la membrana externa mitocondrial a través del amino terminal extendiendo hacia el citoplasma el carboxilo terminal, lo cual permite el transporte de PC entre el retículo endoplásmico (RE) y la membrana externa de otras organelas como

por ejemplo entre RE y la membrana externa de la mitocondria en los sitios de contacto RE-mitocondria (Horibata et al., 2017). Posteriormente, Saita y col. identifican a StarD7 como una proteína de transferencia intramitocondrial de PC, demostrando que la proteasa PARL es un regulador necesario para la localización dual de StarD7 en la mitocondria y el citosol (Saita et al., 2018). Concordante con este reporte, se demostró en ratones que la ablación de PARL causa una encefalopatía similar al síndrome de Leigh, una enfermedad mitocondrial caracterizada por disrupción en la producción de energía, alterando el procesamiento de StarD7 (Spinazzi et al., 2019). La Figura 4 muestra el esquema del procesamiento de StarD7 en la mitocondria y su distribución entre la mitocondria y el citosol.

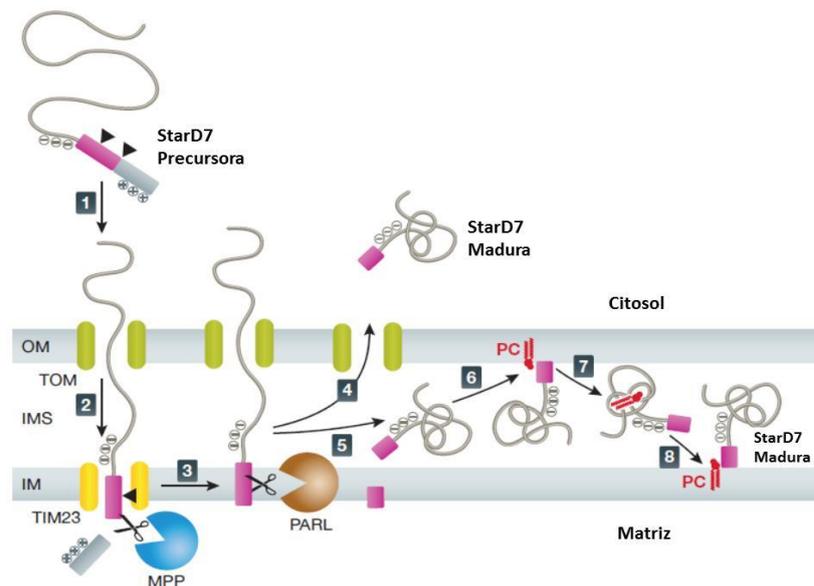


Figura 4. Procesamiento de StarD7 en las mitocondrias y el citosol. 1) StarD7.I es direccionada por la translocasa de la membrana externa mitocondrial (TOM). 2) La secuencia mitocondrial de StarD7.I atraviesa la membrana interna mitocondrial (IM) a través de la translocasa de la membrana interna mitocondrial (TIM23) para llegar a la matriz mitocondrial. StarD7.I es clivada por una peptidasa para generar una isoforma StarD7.I de tamaño intermedio. 3) Esta isoforma se separa del complejo TIM23 para integrarse en la IM. 4) La proteasa PARL cliva la isoforma intermedia de StarD7.I para generar StarD7.II. StarD7.II se libera de la IM. Los residuos cargados negativamente en el extremo N-terminal de StarD7.II promueven la retro-translocación al citosol. 5) El plegamiento de la proteína en el espacio intermembrana (IMS) promueve la internalización de StarD7.II en el espacio IMS. 6) StarD7.II se une a la membrana externa mitocondrial a través de su dominio transmembrana para unir fosfatidilcolina (PC) 7) StarD7.II cargada con PC viaja a través del espacio intermembrana 8) StarD7.II libera PC en la IM. Adaptada de Saita et. al., 2018, (Saita et al., 2018).

2.2. Expresión y regulación de StarD7

Trabajos previos del laboratorio indican que StarD7 tiene una expresión generalizada con diferentes niveles de ARNm en las líneas celulares derivadas de trofoblasto JEG-3, JAR, y HTR-8/SVneo, entre otras (Durand et al., 2004). Ensayos de Western blot e inmunohistoquímicos muestran que la proteína StarD7 está presente en citotrofoblastos (CTB) y sincitiotrofoblastos (STB) normales de placentas de primer trimestre y a término, en mola hidatiforme completa, y en tejido de coriocarcinoma (Angeletti et al., 2008). StarD7 es un gen blanco del miRNA (micro ARN de interferencia) Has-miR-377, que se encuentra disminuido en preeclampsia, lo que sugiere que la expresión de StarD7 puede estar alterada en esta patología (Zhu et al., 2009).

Varios análisis de expresión global de genes han demostrado que StarD7 se expresa en forma diferencial en diferentes células y tejidos sometidos a diversas condiciones experimentales tales como, inflamación, cáncer, cambios en el estado metabólico y de comportamiento (Flores-Martin et al., 2013) así como en trastornos neurológicos (Tabla I). En resumen, estos estudios sugieren que los niveles del transcritto StarD7 están fuertemente controlados en la fisiología normal de la célula.

Tabla I. Expresión diferencial de StarD7 en células y tejidos.

| Condición experimental | Estudio | Célula/Tejido | Niveles de Cambio | Expresión | Ref. |
|------------------------|--|--|-------------------|------------|------|
| Cáncer | Carcinoma ductal <i>in situ</i> vs tejido normal | Células mioepiteliales | 3 | Aumentada | 1 |
| | Leucemia linfocítica crónica B vs células B normales | Células mononucleares de sangre periférica | >97 | Aumentada | 2 |
| | Células microdisecadas de tumor | Tejido colorectal | 2,59 | Aumentada | 3 |
| | Células MA PaCa-2 transfectadas con mir-193b | Línea celular pancreática | 2 | Disminuida | 4 |
| | Células HCT-C18 tratadas con 5 fluoruracilo | Línea celular de cáncer de colon humano | 2 | Aumentada | 5 |

INTRODUCCIÓN

| | | | | | |
|----------------------------------|---|---------------------------------------|-------------------------|---|----|
| | Variación en la expresión de genes del cromosoma 2 | Pulmón Humano | | Asociación negativa con menor sobrevivida | 6 |
| | Periodontitis crónica vs normal | Neutrófilos de sangre periférica | 2,19 | Aumentada | 7 |
| Inflamación | Macrófagos convencionales M1 tratados con fosfolípidos oxidados | Macrófagos | 3,02 | Aumentada | 8 |
| | Neumonía por hipersensibilidad vs Fibrosis pulmonar idiopática | Pulmón | ND | Aumentada | 9 |
| | Miocardiopatía dilatada idiopática vs no falla | Corazón | 0,62 | Disminuida | 10 |
| | Locus de carácter cuantitativo (QTL) en el cromosoma 2 asociado al crecimiento y la gordura | Hígado | 1,17 | Aumentada | 11 |
| Estado Metabólico | Ratones alimentados con dieta con alto contenido graso durante corto tiempo | Músculo esquelético | 1,3 | Aumentada | 12 |
| | Resistencia vs sensibilidad a la insulina | Tejido adiposo omental | 0,28 | Disminuida | 13 |
| | Ratones en ayuna | Intestino delgado | 1,4 | Aumentada | 14 |
| | Pinzamiento hiperinsulínico | Músculo esquelético | 3,31 | Aumentada | 15 |
| | Alargamiento vs acortamiento de la contracción | Biopsia del músculo de la pierna | 2 | Disminuida | 16 |
| Conducta | Miedo condicionado | Cerebro | ND | Aumentada | 17 |
| | Comportamiento del canto de los pájaros (cantan vs no cantan) | Núcleo vocal del proencéfalo, cerebro | DIH | Aumentada | 18 |
| Enfermedades Neuro-degenerativas | Secuenciamiento completo del exoma de dos individuos con discapacidad intelectual | Sangre Periférica | Delección 2q11.1-2q11.2 | | 19 |
| | Injuria post-traumática cerebral | Hipocampo de ratón | -1,25 | Disminuida | 20 |
| | Análisis global de genes co-regulados en enfermedad de Alzheimer y Hungtinton | Cerebro humano | | Ganancia de Co-expresión junto a GPS2 | 21 |

| | | | | | |
|------------------------|--|---------------------------------------|------|---|----|
| | Secuenciamiento de genoma en pacientes con enfermedad de Alzheimer | Cerebro humano | 1,6 | Aumentada | 22 |
| | Secuenciamiento de genoma en pacientes con Esquizofrenia | Corteza orbitofrontal media | 1,63 | Aumentada | 23 |
| Diferenciación Celular | Expresión de genes de la familia de proteínas START | Línea celular de queratinocitos HaCaT | | Aumentada en medio con 1,4 mM de calcio | 24 |

ND: No determinado; DIH: detectada por hibridación in situ.

Referencias: **1.** (Polyak and Hu, 2005), **2.** (Jelinek et al., 2003), **3.** (Wiese et al., 2007), **4.** (Ikeda et al., 2012), **5.** (Xi et al., 2006), **6.** (Bao et al., 2016), **7.** (Wright et al., 2008), **8.** (Kadl et al., 2010), **9.** (Selman et al., 2006), **10.** (Yung et al., 2004), **11.** (Jerez-Timaure et al., 2004), **12.** (de Wilde et al., 2008), **13.** (MacLaren et al., 2008), **14.** (Sokolovic et al., 2010), **15.** (Rome et al., 2003), **16.** (Kostek et al., 2007), **17.** (Park et al., 2011), **18.** (Wada et al., 2006), **19.** (Magi et al., 2013), **20.** (Tweedie et al., 2016), **21.** (Narayanan et al., 2014), **22.** (Bossers et al., 2010), **23.** (Mladinov et al., 2016), **24.** (Elbadawy, 2015).

En el laboratorio se demostró que β -catenina y TCF4 regulan la expresión de StarD7 interactuando con su región promotora. Mediante ensayos con genes reporteros junto a mutaciones en los sitios de unión para los factores transcripcionales SF-1 y TCF4, se demostró que el promotor de StarD7 es sinérgicamente activado por SF-1 y β -catenina y que el sitio de unión para TCF4 (-614/-608) juega un rol importante en esta activación (Rena et al., 2011). β -catenina podría actuar como un puente entre SF-1 y TCF4 formando un complejo ternario el cual estimularía la expresión de StarD7.

Por otro lado, se reportó que los factores de transcripción MEF2D (Myocyte Enhancer Factor 2D) y CRX (Cone-rodhomeobox protein) regulan la expresión de StarD7 en las células fotorreceptoras de retina, siendo uno de los genes requeridos para el desarrollo normal de la retina (Andzelm et al., 2015; Hao et al., 2012). Un análisis de expresión global de genes en células madres de cordón umbilical humano tratadas con el factor neurotrófico derivado de cerebro reveló que StarD7 es uno de los diez genes que aumenta su expresión al cabo de 24 h de tratamiento, aunque se desconoce cuál sería su rol en ese contexto (Paczkowska et al., 2015). Finalmente, se reportó a StarD7 como un gen blanco del microARN mir193b en células pancreáticas, el cual conduce a una disminución en la proliferación celular (Ikeda et al., 2012).

Recientemente, nuestro laboratorio demostró un aumento en la expresión de StarD7 y β -catenina en células JEG-3 crecidas en un medio con alta glucosa; y que estos incrementos fueron abolidos por inhibidores de la vía de la hexosamina (HBP). Por el contrario, una disminución de glucosa condujo a una disminución en la expresión de StarD7 asociada a un incremento en los marcadores de respuesta a las proteínas mal plegadas (*unfolded protein response*, UPR): GRP78 e Ire1 α ; mientras que el aumento de glucosa se asoció a un aumento de StarD7 y baja expresión de GRP78, eIF2 α fosforilado y “splicing” de XBP1. Estos hallazgos indican que glucosa modula la expresión de StarD7 y β -catenina en células trofoblásticas a través de HBP asociada a UPR, resaltando la importancia de estudiar la participación de StarD7 en desórdenes placentales relacionados a la disponibilidad de nutrientes (Flores-Martin et al., 2018). Concordante con los resultados de nuestro laboratorio se reportó que StarD7 es un gen necesario para el crecimiento celular en condiciones de baja glucosa (Minton et al., 2018).

2.3. Impacto de la disminución de StarD7 a nivel celular y molecular

Con el fin de conocer la función de la proteína StarD7 se realizó un análisis global de expresión diferencial de genes. Los resultados obtenidos demostraron que la disminución de la expresión de StarD7 en células trofoblásticas humanas JEG-3, mediante el uso de siRNA dirigido específicamente hacia el ARN mensajero de StarD7, conduce a una alteración en la expresión de un número significativo de genes (Tabla II).

Tabla II. Genes diferencialmente expresados en células JEG-3 tratadas durante 48 h con 200 nM de siD7.1 o siC. Los genes se agruparon de acuerdo a su función celular (Flores-Martin, 2015). Se resaltan aquellos genes que fueron analizados en este trabajo de tesis.

| Gen | Símbolo del Gen | Veces de Cambio | Valor <i>p</i> |
|---|-----------------|-----------------|-----------------------|
| StAR-related lipid transfer (START) domain containing 7 | STARD7 | -2,5 | 9,10e ⁻¹⁰ |
| PROCESOS CELULARES | | | |
| Gap junction protein, alpha 1, 43kDa/Connexin 43 | GJA1/Cn43 | -1,9 | 1,27 e ⁻⁰³ |
| Thrombospondin, type I, domain containing 7A | THSD7A | -1,7 | 4,25 e ⁻⁰⁴ |

TRADUCCIÓN Y TRANSCRIPCIÓN
Factores de transcripción y Reguladores de la Transcripción

| | | | |
|--|--------|------|-----------------------|
| Transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47) | TCF3 | 1,5 | 4,72 e ⁻⁰⁴ |
| Kruppel-like factor 11 | KLF11 | 1,6 | 1,90 e ⁻⁰³ |
| Far upstream element (FUSE) binding protein 1 | FUBP1 | 1,6 | 8,32 e ⁻⁰⁴ |
| Putative nucleic acid binding protein RY-1 | RY1 | 1,6 | 1,14 e ⁻⁰³ |
| DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked | DDX3Y | 1,7 | 2,41 e ⁻⁰⁴ |
| Zinc finger protein 204 | ZNF204 | 1,7 | 2,18 e ⁻⁰⁴ |
| Vestigial like 1 (Drosophila) | VGLL1 | -1,5 | 2,47 e ⁻⁰² |
| Runt-related transcription factor 1 (acute myeloid leukemia 1; aml1 oncogene) | RUNX1 | -1,5 | 2,36 e ⁻⁰² |
| Twist homolog 1 (acrocephalosyndactyly 3; Saethre-Chotzen syndrome) (Drosophila) | TWIST1 | -1,5 | 1,53 e ⁻⁰² |

Proteínas asociadas al AND

| | | | |
|---|--------|------|-----------------------|
| DNA fragmentation factor, 40kDa, beta polypeptide (caspase-activated DNase) | DFFB | 1,7 | 1,80 e ⁻⁰³ |
| Polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide E (80kD) | POLR3E | 1,7 | 6,16 e ⁻⁰⁴ |
| Methyl-CpG binding domain protein 2 | MBD2 | -3,0 | 7,00 e ⁻⁰⁹ |

Procesamiento y transporte del ARN

| | | | |
|--|----------|------|-----------------------|
| M-phase phosphoprotein 9 | MPHOSPH9 | 1,5 | 4,27 e ⁻⁰⁴ |
| G-rich RNA sequence binding factor 1 | GRSF1 | 1,7 | 3,44 e ⁻⁰⁴ |
| La ribonucleoprotein domain family, member 1 | LARP1 | -1,8 | 5,62 e ⁻⁰⁸ |
| Splicing factor 1 | SF1 | -1,8 | 3,95 e ⁻⁰³ |
| Nucleoporinlike 1 | NUPL1 | -1,7 | 4,47 e ⁻⁰⁴ |
| Formin homology 2 domain containing 3 | FHOD3 | -1,6 | 1,32 e ⁻⁰² |

Proteínas Ribosomales

| | | | |
|--|-----------|------|-----------------------|
| Ribosomal protein L15 /// similar to ribosomal protein L15 | LOC646672 | -1,5 | 1,83 e ⁻⁰² |
| Ribosomal protein L31 | RPL31 | -1,5 | 1,02 e ⁻⁰³ |

ENZIMAS**Metabolismo de Carbohidratos**

| | | | |
|------------------------|------|-----|-----------------------|
| Glucosidase I | GCS1 | 1,5 | 4,14 e ⁻⁰⁴ |
| Sorbitol dehydrogenase | SORD | 1,5 | 1,80 e ⁻⁰³ |

Metabolismo de Lípidos

| | | | |
|---------------------------------|-------|------|-----------------------|
| Apolipoprotein M | APOM | -1,6 | 2,67 e ⁻⁰² |
| Abhydrolase domain containing 6 | ABHD6 | -1,5 | 1,10 e ⁻⁰³ |

Metabolismo de aminoácidos

| | | | |
|-------------------------------------|------|------|-----------------------|
| Indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase | INDO | -1,6 | 3,03 e ⁻⁰² |
|-------------------------------------|------|------|-----------------------|

Estrés oxidativo

| | | | |
|--|---------|-----|-----------------------|
| Protein disulfide isomerase family A, member 2 | PDIA2 | 1,5 | 1,09 e ⁻⁰³ |
| Aldehyde dehydrogenase 9 family, member A1 | ALDH9A1 | 1,6 | 2,52 e ⁻⁰⁴ |

| | | | |
|--|----------|------|-----------------------|
| Carboxylesterase 1 (monocyte/macrophageserine esterase 1) | CES1 | -1,6 | 4,47 e ⁻⁰² |
| Aldo-ketoreductase family 1, member C3 (3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type II) | AKR1C3 | -1,6 | 6,86 e ⁻⁰⁴ |
| Steroid-5-alpha-reductase, alhapolypeptide 1 (3-oxo-5 alpha-Steroid delta 4-dehydrogenase alpha 1) | SRD5A1 | -1,5 | 2,93 e ⁻⁰³ |
| P450 (cytochrome) oxidoreductase | POR | -1,5 | 1,05 e ⁻⁰² |
| ATPasas y proteínas relacionadas | | | |
| ATPase, Class V, type 10B | ATP10B | -1,7 | 4,87 e ⁻⁰³ |
| Otras enzimas | | | |
| Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 15 | NUDT15 | 2,1 | 4,85 e ⁻⁰⁴ |
| Heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1 | HS2ST1 | 1,6 | 1,45 e ⁻⁰³ |
| VÍAS DE SEÑALAMIENTO | | | |
| Proteínas quinasas y factores relacionados | | | |
| Calmodulin 1 (phosphorylasekinase, delta) | CALM1 | 1,5 | 3,51 e ⁻⁰⁴ |
| RAS guanyl releasing protein 2 (calcium and DAG-regulated) | RASGRP2 | 2,1 | 1,30 e ⁻⁰⁴ |
| TYRO3 protein tyrosinekinase | TYRO3 | -1,5 | 3,91 e ⁻⁰² |
| TRAF2 and NCK interacting kinase | TNIK | -1,5 | 1,34 e ⁻⁰² |
| Misshapen-likekinase 1 (zebrafish) | MINK1 | -1,5 | 3,00 e ⁻⁰² |
| Otras vías de señalamiento | | | |
| Trefoil factor 1 | TFF1 | 1,5 | 1,35 e ⁻⁰³ |
| Nicalinhomolog (zebrafish) | NCLN | 1,5 | 4,79 e ⁻⁰⁴ |
| Ankyrinrepeatdomain 28 | ANKRD28 | 1,6 | 7,87 e ⁻⁰⁵ |
| Ankyrinrepeatdomain 46 | ANKRD46 | 1,9 | 3,32 e ⁻⁰³ |
| Programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor) | PDCD4 | -1,6 | 1,78 e ⁻⁰² |
| Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 | PMAIP1 | -1,6 | 1,47 e ⁻⁰² |
| PROTEÍNAS DEL CITOESQUELETO Y DE LA MATRIZ EXTRACELULAR | | | |
| Collagen, type I, alpha 1 | COL1A1 | 1,5 | 1,37 e ⁻⁰³ |
| Nidogen-1 | NID1 | 1,8 | 2,70 e ⁻⁰⁴ |
| Osteomodulin | OMD | 1,8 | 3,69 e ⁻⁰⁵ |
| Glypican 4 | GPC4 | -1,5 | 1,09 e ⁻⁰² |
| TRÁFICO DE VESÍCULAS | | | |
| Microtubule-actincrosslinking factor 1 | MACF1 | 1,5 | 1,10 e ⁻⁰³ |
| KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) containing 1 | KDEL1 | 1,5 | 2,06 e ⁻⁰³ |
| Kinesin light chain 1 | KLC1 | 1,5 | 3,87 e ⁻⁰⁴ |
| Choroideremia-like (Rab escort protein 2) | CHML | -1,7 | 5,14 e ⁻⁰⁵ |
| RAB GTPase activating protein 1-like | RABGAP1L | -1,5 | 2,50 e ⁻⁰² |
| RECEPTORES, TRANSPORTADORES Y CARRIERS | | | |
| Receptores de membrana | | | |

| | | | |
|---|-------------|------|-----------------------|
| Epithelialmembrane protein 2 | EMP2 | 1,5 | 7,20 e ⁻⁰⁵ |
| Transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) | TGFBR2 | -1,5 | 7,26 e ⁻⁰³ |
| Transportadores y carriers | | | |
| Solute carrier family 16, member 3 (monocarboxylic acid transporter 4) | SLC16A3 | 1,5 | 2,0 e ⁻⁰⁴ |
| Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 7 | SLC7A7 | -1,6 | 9,11 e ⁻⁰⁵ |
| Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 13 | KCNJ13 | -1,5 | 2,22 e ⁻⁰² |
| Solute carrier family 16, member 4 (monocarboxylic acid transporter 5) | SLC16A4 | -1,5 | 1,59 e ⁻⁰³ |
| ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2 | ABCG2 | -1,5 | 1,15 e ⁻⁰³ |
| SAR1 gene homolog B (S. cerevisiae) | SAR1B | 1,6 | 6,32 e ⁻⁰⁴ |
| CATABOLISMO DE PROTEÍNAS | | | |
| Enzimasqueconjugan ubiquitina | | | |
| Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 12 | PSMD12 | 1,6 | 1,56 e ⁻⁰³ |
| SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2 | SMURF2 | 1,7 | 6,60 e ⁻⁰² |
| Ubiquitinspecificpeptidase 52 | USP52 | -1,5 | 4,12 e ⁻⁰² |
| Proteínasrelacionadas al proteasoma | | | |
| Chromosome 3 open readingframe 63 | C3orf63 | 1,5 | 2,16 e ⁻⁰³ |
| Chromosome 6 open readingframe 32 | C6orf32 | -1,5 | 3,45 e ⁻⁰⁴ |
| Proteasas | | | |
| Alanyl (membrane) aminopeptidase (aminopeptidase N, Aminopeptidase M, microsomalaminopeptidase, CD13, p150) | ANPEP | 1,5 | 2,07 e ⁻⁰³ |
| Caspase 8, apoptosis-related cysteinepeptidase | CASP8 | 1,5 | 2,11 e ⁻⁰³ |
| Membranemetallo-endopeptidase | MME | -1,8 | 1,69 e ⁻⁰³ |
| Chymotrypsin-like | CTRL | -1,5 | 4,00 e ⁻⁰³ |
| RESPUESTA IMMUNE, CITOQUINAS Y PROTEÍNAS RELACIONADAS | | | |
| Interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa | ILF3 | 1,5 | 1,77 e ⁻⁰³ |
| Caspase recruitment domain family, member 10 | CARD10 | 1,5 | 9,76 e ⁻⁰⁴ |
| Pre-B-cell colony enhancing factor 1 | PBEF1 | 1,5 | 1,67 e ⁻⁰³ |
| Interleukin 6 signaltransducer (gp130, oncostatin M receptor) | IL6ST | 1,6 | 7,02 e ⁻⁰⁴ |
| Pre-B-cell leukemiahomeobox 1 | PBX1 | 1,8 | 1,79 e ⁻⁰² |
| Interferon, alpha-inducible protein 6 | IFI6 | -1,5 | 4,48 e ⁻⁰⁴ |
| Complement component 4A (Rodgers blood group) /// Complement component 4B (Childo blood group) | C4A /// C4B | -1,5 | 2,07 e ⁻⁰² |
| OTROS | | | |
| HEG homolog 1 (zebrafish) | HEG1 | 1,5 | 3,96 e ⁻⁰⁴ |
| WD repeatdomain 43 | WDR43 | 1,5 | 2,07 e ⁻⁰³ |

| | | | |
|--|--------|------|-----------------------|
| Transmembrane protein 5 | TMEM5 | 1,5 | 3,13 e ⁻⁰⁴ |
| Epithelialmembrane protein 2 | EMP2 | 1,5 | 7,20 e ⁻⁰⁵ |
| LSM14A, SCD6 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>) | LSM14A | 1,6 | 1,24 e ⁻⁰³ |
| Coagulation factor V (proaccelerin, labile factor) | F5 | -1,5 | 4,18 e ⁻⁰² |

Algunos de los genes alterados detectados en el análisis del microarreglo fueron validados mediante ensayos de qRT-PCR. Se demostró que el silenciamiento de StarD7 produce en la línea celular JEG-3 una disminución de los niveles de ARNm que codifica a ABCG2 así como de su proteína (Flores-Martin et al., 2012). Además, se observó una disminución en la biosíntesis de fosfolípidos asociado a disminución en la migración y proliferación celular y un aumento en la expresión de marcadores de diferenciación celular como β -hCG, y sincitina. Por otro lado, Yang y col reportaron que ratones StarD7 +/- desarrollan una respuesta alérgica asociada a un aumento en la permeabilidad epitelial pulmonar y dermatitis atópica espontánea; mientras que la delección global del gen en ratones StarD7 -/- produce letalidad embrionaria entre los días 10-11 de gestación, probablemente relacionada a una disrupción en el desarrollo cardiovascular (Yang et al., 2015). Recientemente, nuestro grupo demostró en células de carcinoma hepático HepG2 que la depleción de StarD7 genera alteraciones morfológicas en el RE y en las crestas mitocondriales. Estos cambios morfológicos se acompañaron por un estrés de RE con activación de la vía UPR y aumento en las especies reactivas del oxígeno (ROS). La activación de UPR se confirmó mediante la determinación de los niveles de expresión de las proteínas IRE1 α , calnexina, Grp78/BiP, PERK y p-eIF2 α . Se reportó que el silenciamiento genera un aumento en la degradación de p53 sin modificación en los niveles de PARP, JNK, anexina V y LC3-II (Flores-Martin et al., 2016). Consistente con estos resultados, datos obtenidos por Horibata y col. demuestran que la deficiencia de StarD7 afecta adversamente la composición de PC, la actividad respiratoria y la estructura de las crestas mitocondriales (Horibata et al., 2016; Horibata et al., 2020; Yang et al., 2017).

En investigaciones posteriores Yang y col. encontraron alteraciones similares en las mitocondrias de células epiteliales de pulmón BEAS-2B en las cuales se redujo la expresión de StarD7 mediante el uso de shRNA. Estos cambios morfológicos observados en las mitocondrias de las células BEAS-2B se asociaron a una alteración en

la homeostasis mitocondrial con una disminución en la producción de ATP mitocondrial, daño en el ADN mitocondrial y un aumento en la producción de ROS mitocondrial. También se observó un aumento en la permeabilidad de las células silenciadas asociadas a la disminución de las proteínas de unión: claudina-1, claudina-4 y *zonula occludens-1* (ZO-1). La alteración de la homeostasis mitocondrial producida por la disminución en la expresión de StarD7 fue confirmada en ensayos *in vivo* realizados en ratones en los cuales se delecionó el gen de StarD7 en células epiteliales de pulmón mediante Shh-Cre (Yang et al., 2015; Yang et al., 2017). La disfunción mitocondrial, estrés oxidativo y disfunción de la barrera epitelial podrían ayudar a explicar la exagerada respuesta alérgica pulmonar (Mabalirajan et al., 2008) que se produce en ratones StarD7 haploinsuficientes (StarD7 +/-) y los ataques de asma agudo en niños, los cuales presentan disminuido en un 50% la expresión de StarD7 en sus células epiteliales nasales (Yang et al., 2015).

3. Comunicación celular

Los contactos célula-célula que implican la comunicación directa son fundamentales para la organización superior de las células y proporcionan la base para la formación de tejidos y órganos. La comunicación entre células vecinas permite mantener la homeostasis de un tejido a través de la interacción de las diferentes redes de señalización extracelular, intracelular e intercelular.

La comunicación celular es la capacidad que tienen las células de intercambiar información con el medio extracelular y/o con otras células, permitiendo responder coordinadamente ante estímulos internos o externos. La comunicación entre dos células adyacentes, mediante el desarrollo de uniones intercelulares especializadas denominadas complejos de adhesión, permite la formación de canales de comunicación directa (Figura 5). Los complejos de adhesión: "*Tight junctions*, TJ" (uniones estrechas); "*Adherens junctions*, AJ" (uniones adherentes); "*Gap junctions*" (uniones comunicantes); y desmosomas permiten que las células adyacentes se mantengan muy próximas entre sí proporcionando solidez estructural al tejido. Los complejos de adhesión tienen distintas funciones: las TJ están involucradas principalmente en la regulación de la comunicación intercelular y el transporte

paracelular (Abraham et al., 2001), las AJ juegan un rol importante en el desarrollo y la homeostasis de los tejidos, los desmosomas junto con el citoesqueleto proporcionan principalmente resistencia mecánica a la célula y crean una red estructural fuerte que une las células en todo el tejido (Kottke et al., 2006) y las uniones Gap forman “puentes” entre dos células que permiten el paso de nutrientes o solutos entre ellas. La alteración de los complejos de adhesión afecta la función del tejido pudiendo desencadenar el desarrollo de patologías entre las que se incluyen diferentes tumores. Entre los complejos de adhesión, la comunicación intercelular mediada por Gap podría describirse como la más crítica para el mantenimiento de la homeostasis y función tisular, debido a que regula numerosos procesos fisiológicos tales como proliferación celular, acoplamiento metabólico, químico y eléctrico o transmisión de señales de muerte celular, entre otros procesos. En organismos invertebrados las uniones comunicantes están formadas por inexas, mientras que en los vertebrados están formadas por conexinas (Cxs). Ambas familias proteicas comparten características estructurales aunque presentan poca homología entre sus secuencias de aminoácidos.

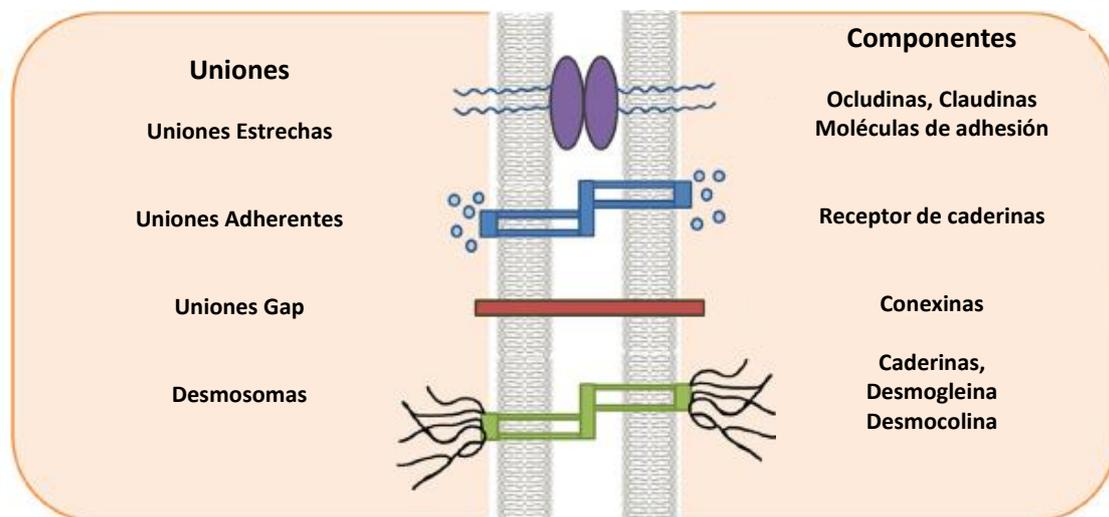


Figura 5. Representación esquemática de las uniones intercelulares epiteliales en las células de vertebrados. Las uniones estrechas (TJ) y uniones adherentes (AJ) se localizan en la región más apical de la célula mientras que los desmosomas se localizan en la región basal. Adaptada de Bhat, A. A et. al., 2018, (Bhat et al., 2018).

3.1 La familia de las Conexinas

Las conexinas son proteínas transmembrana que se expresan en la mayoría de las células del organismo donde se encuentran formando canales o hemicanales, que permiten la comunicación entre células vecinas o la comunicación con la matriz extracelular, respectivamente (Naus and Laird, 2010). El canal permite el paso de sustancias como iones, azúcares sencillos, segundos mensajeros como el AMPc o calcio, aminoácidos, o pequeños ARNs, pero no proteínas, lípidos o moléculas de ARN largas (Laird, 2006).

En el genoma humano se han encontrado 21 genes que codifican a conexinas. Las Cxs se denominan según su peso molecular (de 26 a 59 kDa) por ejemplo: Cx26, Cx32 o Cx43. Según la similitud de secuencia y la longitud de los dominios citoplasmáticos se dividen en cinco subgrupos: α , β , γ , δ y ϵ (ver <http://www.genenames.org/>). Topológicamente todas las Cxs presentan estructuras similares compuestas por nueve dominios: cuatro regiones transmembrana, dos bucles extracelulares, un bucle citoplasmático con el extremo C-terminal y N-terminal citoplasmático (Figura 6). Los cuatro dominios hidrofóbicos transmembrana y los dos bucles extracelulares contienen residuos o sustituciones conservadas entre las diferentes Cxs, mientras que el extremo C-terminal posee la principal diferencia entre las Cxs con gran variación en su longitud y secuencia (Leithe et al., 2018).

3.2 Ciclo de vida de las conexinas

Las Cxs tienen una vida media corta de entre 1-5h aproximadamente. Al igual que otras proteínas de membrana, las Cxs son sintetizadas en el RE (Figura 6) y transportadas al aparato de Golgi donde se produce su oligomerización (Laird, 2006), específicamente en el trans Golgi network (TGN). Cx26 sería una de las pocas Cxs que pueden ir directamente a la membrana plasmática sin pasar por el aparato de Golgi (Mercier and Hatton, 2001). Después de la oligomerización las Cxs se pueden insertar directamente en la membrana plasmática mientras que el mayor porcentaje es transportado a lo largo de los filamentos microtubulares a través de vesículas. Una vez insertados en la membrana plasmática, los hemicanales de Cxs pueden difundir libremente en la bicapa lipídica encontrándose en forma individual o agrupados en

placas constituidas por 10-10000 hemicanales, siendo funcional de ambas formas. Cada uno de estos hemicanales puede acoplarse con hemicanales de otra célula en estrecho contacto, formando así canales intercelulares cerrados al espacio extracelular y que ponen en contacto ambos citoplasmas; o puede comunicar el citoplasma con la matriz extracelular. Se ha demostrado mediante ensayos de FRAP (fluorescent recovery after photobleaching) que los hemicanales que se encuentran en las regiones más externas de las placas son los más jóvenes mientras que en el centro de las placas se posicionan los más envejecidos que se preparan para la internalización y su posterior degradación en grandes estructuras vesiculares de doble membrana denominadas uniones anulares o conexomas.

Existen tres vías posibles de degradación de Cxs: lisosomal, proteosomal y autofágica. La degradación vía lisosomal y proteosomal han sido demostradas mediante ensayos de inhibición con drogas y microscopía electrónica, degradaciones mediadas por monoubiquitinación y poliubiquitinación, respectivamente (Falk et al., 2014). La degradación mediante autofagia se demostró por ensayos de co-localización de Cx con LC3, confirmando la presencia de Cx en autofagosomas por microscopía electrónica.

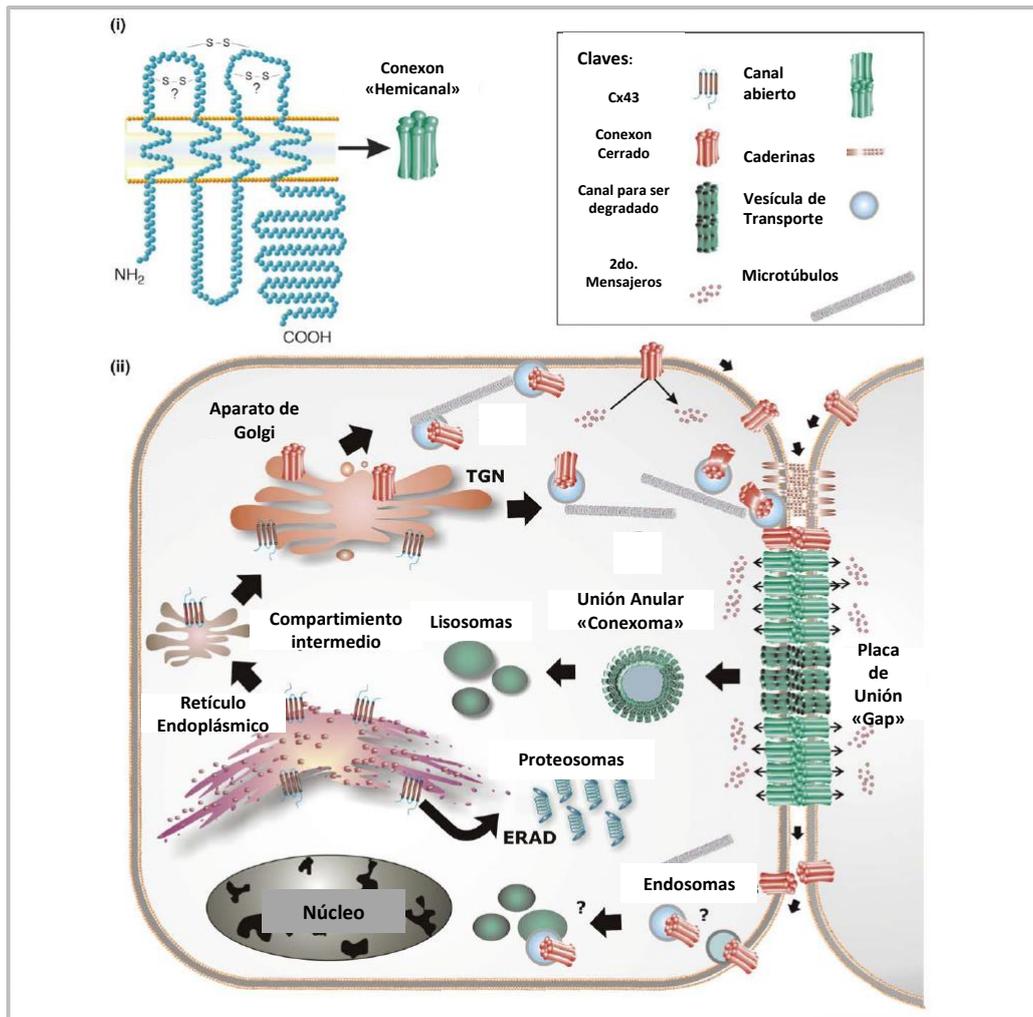


Figura 6. El ciclo de vida de Conexina 43 (Cx43). (i) Cx43 es una proteína polipéptica que oligomeriza formando un hexámero llamado conexon o hemicanal. (ii) Representación esquemática que ilustra los eventos relacionados al ensamble y recambio de los complejos de unión. ERAD, retículo endoplásmico asociado a la degradación. Adaptada de Laird, 2010, (Laird, 2010).

3.3 Conexina 43

Conexina 43 (Cx43) es la conexina mejor caracterizada hasta el presente debido a su importancia en la función y expresión en una variedad de tipos celulares entre los que se incluyen cardiomiocitos, queratinocitos, astrocitos, células endoteliales y hepatocitos. Cx43 tiene un rol fundamental en los tejidos excitables facilitando la comunicación y transmisión de potenciales rápidos entre células adyacentes. Esta comunicación rápida sincroniza los latidos cardíacos y propaga los impulsos eléctricos en el cerebro (Ribeiro-Rodrigues et al., 2017). Si bien inicialmente se ha descrito a Cx43 como una proteína que forma uniones Gap, trabajos recientes han demostrado

que Cx43 participa en otros tipos de comunicación intercelular como los túneles de nanotubos (TNT) y vesículas extracelulares (Aasen et al., 2019a; Ribeiro-Rodrigues et al., 2017). TNTs son estructuras de membranas altamente dinámicas, delgadas (con un diámetro de 50-700 nm) y largas (hasta 100 μm) que permiten la transferencia entre células de diversos materiales, incluyendo miARNs, proteínas, vesículas endocíticas, lisosomas y vesículas derivadas del RE y Golgi, y organelas citoplasmáticas incluyendo mitocondrias.

Se ha descrito la presencia de Cx43 en la membrana mitocondrial de las células del tejido adiposo marrón donde se propone que jugaría un rol fundamental en el mantenimiento de la integridad mitocondrial, ya que se observó que variaciones en los niveles de Cx43 producen alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial generando producción de ROS (Cronier et al., 2002; Kim et al., 2017). Además, se demostró que Cx43 forma hemicanales en cardiomiocitos de ratón, rata, cerdo y humanos, regulando el flujo de K^+ mitocondrial (Miro-Casas et al., 2009) y ejerciendo una función protectora esencial tras un proceso de isquemia (Boengler et al., 2005).

Mutaciones en el gen GJA1 que codifica a Cx43 puede causar un desorden pleiotrópico conocido como displasia oculo-dento-digital (ODDD, OMIM no. 164210). Esta enfermedad se caracteriza por cambios físicos variables en los ojos, dentición y dedos, además de frecuentes desórdenes neurológicos. Los síntomas neurológicos incluyen disartria, vejiga neurogénica, ataxia, debilidad del músculo tibial anterior y apoplejía. Algunos pacientes presentan orejas displásicas y pérdida auditiva de tipo conductivo (Vreeburg et al., 2007).

El ARNm de Cx43 es una molécula policistrónica y un ejemplo de traducción alternativa. Después del primer AUG (metionina), hay 6 codones AUG adicionales, lo que indica que la traducción ribosomal puede iniciarse en múltiples sitios internos originando un total de siete formas moleculares de Cx43 (Salat-Canela et al., 2014). La Figura 7 muestra un esquema de las diferentes isoformas de Cx43 y un ensayo de Western blot de extractos cardíacos revelados con un anticuerpo monoclonal que reconoce el C-terminal de Cx43. Además de la isoforma de 43 kDa, las tres isoformas más grandes (32 kDa, 29 kDa y 26 kDa) contienen dos dominios transmembrana, parte

del bucle intracelular, y el C-terminal. Las tres isoformas más pequeñas de 20 kDa, 11 kDa y 7 kDa incluyen parte de la región del C-terminal. La isoforma de 20 kDa contiene además el último dominio transmembrana (Epifantseva and Shaw, 2018). Se ha sugerido que la isoforma de 20 kDa contribuye al tráfico vesicular de la isoforma de 43 kDa desde RE/TGN y que la inhibición de la vía de mTOR/PIK/AKT incrementa la traducción alternativa de la isoforma de 20 kDa (Smyth and Shaw, 2013).

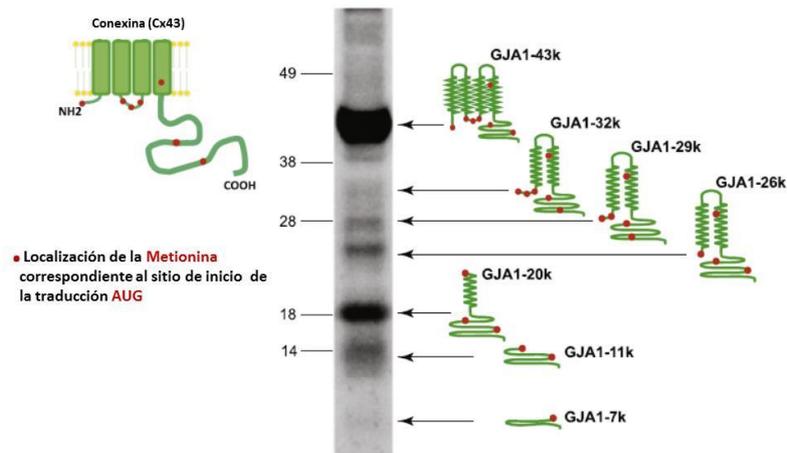


Figura 7. La traducción del ARNm de GJA1 origina siete proteínas. Ensayo de Western blot de extractos cardíacos revelados con un anticuerpo monoclonal que reconoce el C-terminal de Cx43. Adaptada de Epifantseva y Shaw et al., 2018, (Epifantseva and Shaw, 2018).

3.4 Función no canónica de Cx43 o independiente de la función canal

Como se mencionó, la función más conocida de las Cxs es la de formar canales intercelulares en la membrana plasmática (Gaps) o **función canónica** la cual controla el flujo directo de iones y pequeñas moléculas. Sin embargo en los últimos años se han descrito otras funciones de las Cxs denominadas función no canónica o independiente de la función canal involucrada en diferentes procesos celulares como la expresión de genes, proliferación, migración, apoptosis, diferenciación y supervivencia (Aasen, 2015; Basheer and Shaw, 2016; Vinken et al., 2012). Algunos de estos procesos han sido específicamente atribuidos al dominio C-terminal (CT).

El extremo CT de Cx43 contiene 150 aminoácidos altamente conservados entre especies de vertebrados, que representan el 39% de la proteína, sugiriendo funciones

compartidas entre las distintas especies. El CT es rico en arginina, asparragina, ácido aspártico, prolina y serina. La elevada composición en prolinas y serinas tiene consecuencias fisiológicas importantes y hace de esta región de Cx43 un potencial blanco de interacciones proteicas y fosforilaciones mediadas por quinasas (Leithe et al., 2018). A través de su CT Cx43 puede sufrir numerosas modificaciones post-traduccionales como fosforilación, acetilación, ubiquitinación, sumoilación y S-nitrilación. Estas modificaciones permiten que Cx43 interactúe con proteínas como proteínas quinasa o ubiquitina ligasa E3 que regulan su función. Otras proteínas que se unen a la región CT de Cx43 incluyen componentes del citoesqueleto así como varias proteínas de anclaje que facilitan la interacción entre Cx43 y el citoesqueleto. Cx43 interactúa con proteínas que participan en las vías de señalamiento mitogénico y el control del ciclo celular. Algunas interacciones son transitorias y pueden ser controladas por modificaciones post-transduccionales en residuos específicos en el CT. Esta propiedad del CT de Cx43 representa la base estructural para las funciones independientes del canal que por definición no requieren el intercambio de moléculas entre células adyacentes o entre el citosol y el espacio extracelular. La regulación de la fosforilación del CT de Cx43 es crítica no sólo por su efecto en la organización y funcionalidad de los canales que forma, sino también porque facilita o inhibe interacciones con otras proteínas, las cuales van a regular diferentes rutas de señalización o modular procesos tales como proliferación celular. Cx43 regula **migración celular** y estos efectos parecen ser principalmente dependientes de la presencia del CT de Cx43. Se ha descrito que el CT (desde el aminoácido 257 al 382) es suficiente para promover la migración celular. La localización nuclear del CT podría ejercer efectos sobre la expresión génica. Cx43 participa en la regulación del crecimiento celular, vía interacción con proteínas tales como p21 y el control de la expresión génica de proteínas implicadas en el ciclo celular (Aasen, 2015).

3.5 El interactoma del extremo C-terminal de Cx43

Como se mencionó, el extremo CT proporciona sitios para interacciones proteína-proteína y está sujeto a modificaciones post-traduccionales que regulan el

tráfico intracelular de Cxs y la activación de los canales GJIC (*Gap junctional intercellular communication*) (Solan and Lampe, 2009).

Cx43 interacciona directamente con los microtúbulos e indirectamente con el citoesqueleto de actina vía proteínas adaptadores, de las cuales ZO-1 y drebrina (*developmentally regulated brain protein*) son las más conocidas (Figura 8). Existen numerosas evidencias sobre la interacción de Cx43 con proteínas asociadas al citoesqueleto o proteínas que regulan procesos celulares como proliferación, diferenciación y migración. La interacción de Cx43 con los microtúbulos explicaría los efectos observados sobre la migración y la polaridad de fibroblastos y cardiomiocitos de ratón al deplecionar totalmente Cx43 (Francis et al., 2011; Rhee et al., 2009)

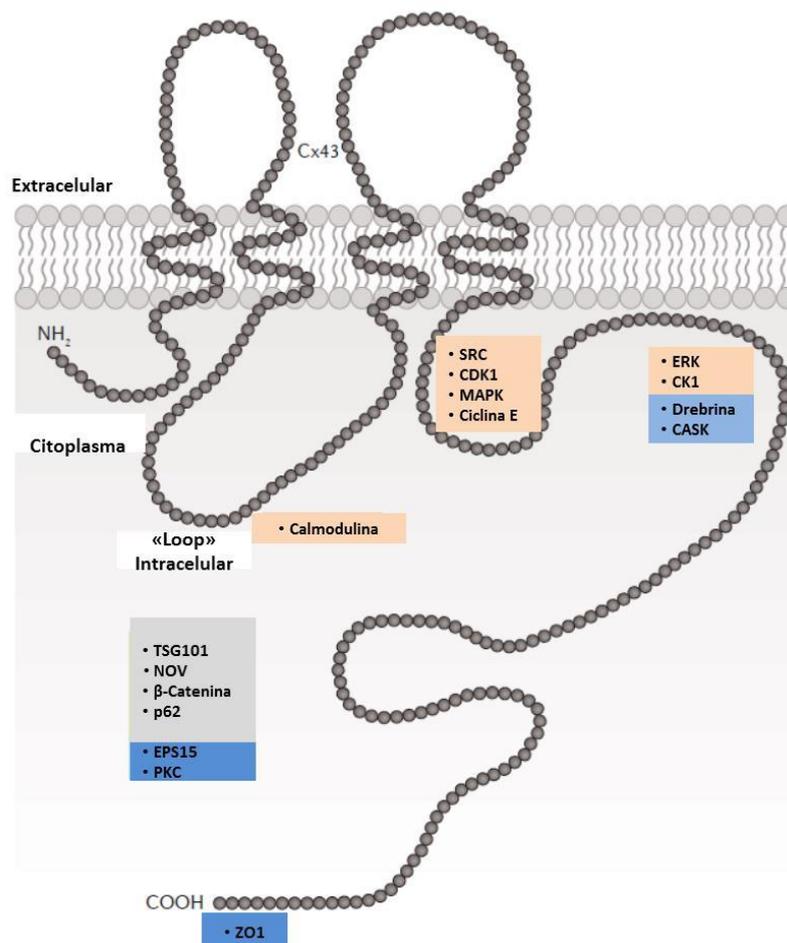


Figura 8. El interactoma de Cx43: Las proteínas de unión a Cx43 (SRC, CDK1, MAPK, Ciclina E, ERK, CK1, Drebrina, CASK, Calmodulina y ZO1) están posicionadas cerca del sitio de unión al C-terminal. Los sitios de unión específico en el C-terminal para TSG101, NOV, β-catenina, BAX, p62, EPS15 y PKC están menos definidos. Adaptada de Laird y Lampe, 2018, (Laird and Lampe, 2018).

La interacción del extremo CT de Cx43 con distintas proteínas reguladoras del crecimiento, diferenciación y migración celular está ampliamente demostrada en distintas publicaciones (Leithe et al., 2018; Sorgen et al., 2018). Entre las interacciones reportadas se encuentra la interacción con β -catenina, Bax, β -arrestina, CNN3/NOV, c-Src/PTEN/Csk, ciclina E, Hsc70, caveolina-1 e integrina $\alpha 5$.

3.6 Participación de Cx43 en la migración celular

La migración celular es un proceso integrado que involucra la coordinación de señales bioquímicas y biomecánicas complejas para modular la morfología celular al reorganizar dinámicamente los filamentos del citoesqueleto y causar la tracción celular. Este proceso es importante en el desarrollo y en el mantenimiento de los organismos pluricelulares tales como la formación de tejidos durante el desarrollo embrionario, la cicatrización, la angiogénesis, la respuesta inmune y la placentación (Silva and Serakides, 2016), entre otros, los cuales requieren de movimientos celulares sincronizados en una dirección particular y hacia sitios específicos (Schwartz and Horwitz, 2006). Además, la migración celular tiene un rol importante en los procesos patológicos como el crecimiento tumoral y la metástasis (Wu and Wang, 2019).

Numerosas publicaciones demuestran la participación de las Cxs en la migración celular tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, estudios *in vitro* han demostrado la participación de las Cxs en la migración de células derivadas del cerebro (células de glioma, células neuronales, astrocitos), fibroblastos (células NIH3T3), células epiteliales (células HeLa) y células cardíacas (células H9C2). También se ha reportado la participación de las Cxs en la migración celular durante el desarrollo del corazón, del cerebro y los vasos coronarios (Kameritsch et al., 2012).

Particularmente, se ha descrito que Cx43 está altamente expresada en células de la cresta neural durante la embriogénesis y que su sobre-expresión aumenta la motilidad y la direccionalidad en estas células (Xu et al., 2006). Por el contrario, la depleción de los niveles de Cx43 en estas células y en fibroblastos embrionarios de ratón NIH3T3 produce una disminución en la migración celular (Francis et al., 2011; Rhee et al., 2009). La variación en los niveles de Cx43 produce cambios en el citoesqueleto, las cuales afectan distintos procesos celulares como la morfología

celular, la adhesión celular, la polaridad celular, la formación de lamelopodios, etc. El principal efecto en la migración producida por la pérdida de Cx43 es la ausencia de movimiento organizado, por falta de polaridad celular, y en segundo lugar se señala la incapacidad de la célula de migrar hacia un objetivo específico a pesar de la presencia de quimioattractantes. Esto se ha confirmado al comparar células que no expresan Cx43 con respecto a células que expresan Cx43, como son las células de plasmocitoma y células de linfoma, respectivamente (Matsuuchi and Naus, 2013).

Existen evidencias que permiten confirmar que la participación de las Cxs en la migración es una función independiente de canal, el extremo CT regularía la migración a través de su interacción con distintas proteínas asociadas al citoesqueleto, ya que al truncar una porción del extremo CT de Cx43 en fibroblastos y en células de la glía, se observó una disminución en la migración (Bates et al., 2007; Moorby and Patel, 2001).

Se ha demostrado que Cx43 ejerce efectos sobre la migración al interferir con la señalización de los receptores, la remodelación del citoesqueleto y la regulación de la dinámica de la tubulina. Estos efectos dependen principalmente de la presencia del extremo CT de Cx43. Aunque algunos resultados son controversiales, la importancia del extremo CT de Cx43 en la migración celular está ampliamente demostrada en células HeLa y en células de glioma; resultados similares se encontraron en experimentos *in vivo* en los cuales se delecionó el extremo CT de Cx43. Contrariamente a lo informado, en una subpoblación de células de glioma se encontró que al truncar el extremo CT de Cx43 la migración se ve afectada de forma positiva (Moorby and Patel, 2001).

4. Organelas y proteínas involucradas en la migración celular

4.1 Aparato de Golgi y centro organizador de microtúbulos (MTOC)

En las células de los mamíferos, el aparato de Golgi es una organela de una sola copia, compuesto por una pila de cisternas aplanadas unidas lateralmente formando una cinta compactada. Se localiza en la región yuxtannuclear asociado al centrosoma, durante la interfase, y fragmentado y disperso durante la mitosis. Está polarizado tanto en su estructura como en su función, donde el lado cis- y el trans ejercen diferentes funciones en términos de modificación post-transduccional de proteínas, composición

de lípidos, y los procesos de distribución del cargo (proteínas, lípidos y polisacáridos). El cis-Golgi recibe el cargo del RE y del compartimento intermedio. Las proteínas que necesitan ser recicladas de nuevo al RE se incorporan en las vesículas COPI que se forman en el cis-Golgi. El cargo del cis-Golgi progresa al medial y trans-Golgi donde adquiere varias modificaciones post-traduccionales. Finalmente, el cargo llega al trans-Golgi para ser distribuido a los diversos compartimentos post-Golgi (endosomas, lisosomas y la membrana plasmática). Además de estas funciones conocidas, el aparato de Golgi está involucrado en la apoptosis, mitosis, inflamación, metabolismo, autofagia, polarización celular y migración celular (Kulkarni-Gosavi et al., 2019; Millarte and Farhan, 2012).

Por otro lado, el centrosoma funciona como el principal MTOC de la célula y desempeña un papel importante en la polarización celular y la ciliogénesis. Se localiza en la región perinuclear y está formado por dos centriolos rodeados por la matriz pericentriolar. Los complejos de anillos de γ -tubulina de la matriz pericentriolar permiten que el centrosoma nucleee en forma radial los microtúbulos durante la interfase cuyos extremos menos (-) están asociados al centrosoma y cuyos extremos más (+) se extienden hacia la periferia celular (Figura 9). Esta organela concentra la maquinaria molecular para modelar los microtúbulos, estabilizar el polímero naciente y organizar los microtúbulos resultantes en estructuras de orden superior (Sutterlin and Colanzi, 2010).

Se ha reportado que las proteínas residentes en el Golgi son necesarias para la organización y el posicionamiento del centrosoma (Kodani and Sutterlin, 2008), mientras que los microtúbulos nucleados en el centrosoma son necesarios para el posicionamiento pericentriolar del Golgi (Corthesy-Theulaz et al., 1992). Ambas organelas tienen una relación funcional en la migración celular. Se ha demostrado que los fibroblastos migratorios responden a señales externas como gradientes quimiotácticos, heridas y campos eléctricos, llevando a que las células se polaricen morfológicamente. La polarización celular se produce por una reorganización del citoesqueleto, reubicando el MTOC y el aparato de Golgi hacia el frente del núcleo, mientras que en algunas células de migración rápida como los neutrófilos o células T el MTOC se suele posicionar detrás del núcleo (Ridley et al., 2003). Esto da lugar al

ensamble de microtúbulos en la parte frontal de la célula y a la promoción de la polimerización dinámica de actina para extender una protuberancia de la membrana. La reorientación del Golgi hacia el borde delantero de la célula suministra membranas y productos que facilitan la formación de estas protuberancias.

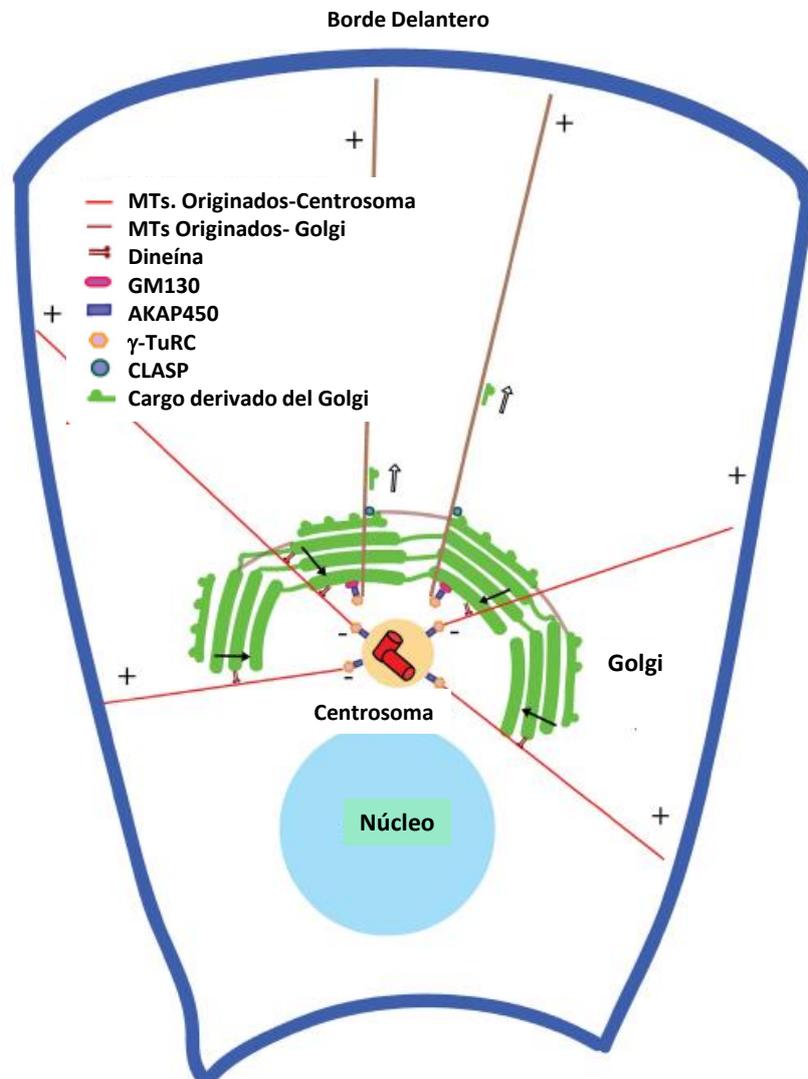


Figura 9. Microtúbulos nucleados en el Golgi y en el MTOC durante la migración celular. El centrosoma nuclea una matriz radial de microtúbulos (rojo) cuyos extremos menos (-) están anclados en el centrosoma y cuyos extremos más (+) se extienden a la periferia celular. Esta población de microtúbulos depende de los complejos de la proteína de ensamblaje AKAP450 para su nucleación y mantiene la localización pericentriolar del Golgi mediante un mecanismo mediado por dineína (flechas cerradas). El aparato Golgi nuclea microtúbulos (marrones) que se extienden asimétricamente hacia el borde delantero de una célula migratoria. La nucleación de los microtúbulos en el Golgi requiere de la proteína GM130, que recluta complejos AKAP450 y γ -TuRC al aparato Golgi. Los microtúbulos nucleados por el Golgi están recubiertos con proteínas CLASP y son necesarios para la formación del Golgi. Además, son necesarios para la migración celular facilitando el transporte polarizado hacia el borde delantero de la célula (flechas abiertas). Adaptada de Sütterlin y Colanzi, 2010, (Sütterlin and Colanzi, 2010).

Por otro lado, el aparato de Golgi está involucrado en distintas vías de señalización que participan en la migración celular como las MAPK, ciclina dependientes de quinasas, mTOR y GTPasas, lo cual destaca la importancia de esta organela en la migración celular. Aunque en experimentos realizados *in vivo* todavía resulta controversial la ubicación del aparato de Golgi en una célula polarizada, está claro que el Golgi tiene un papel activo en la migración. En experimentos en los que se disminuyó la expresión de proteínas estructurales del Golgi como golgina-160 y GMAP210, o se silenció la expresión de quinasas y fosfatasas se observó una fragmentación en la estructura del Golgi y una fuerte disminución de la migración celular (Farhan et al., 2010; Yadav et al., 2009).

4.2 Contribución del factor de transcripción Twist1 a la migración celular

Twist1 es un factor de transcripción que pertenece a la familia de proteínas hélice-bucle-hélice con alto grado de conservación entre distintas especies como humano, ratón, rana, *Drosophila*, sanguijuela y *Caenorhabditis elegans*. Es esencial en la embriogénesis para la especificación y diferenciación del mesodermo regulando la transición epitelio mesenquimal. Además, juega un papel clave en la promoción de la metástasis tumoral y está asociado con una potente capacidad de invasión (Zhao et al., 2017). Se ha descrito niveles aumentados de Twist1 en distintos tipos de cáncer como el cáncer de mama, hígado, próstata y gástrico y su expresión está asociada a fenotipos de cáncer invasivo y metastásico. Por ejemplo, se reportó que la disminución de Twist1 en células de cáncer de próstata suprime la migración e invasión celular, mientras que la sobreexpresión de Twist1 en la línea celular de cáncer gástrico BGC-823 aumenta la migración celular (Kwok et al., 2005; Feng et al., 2009). Otros antecedentes que demuestran la relación directa entre los niveles de Twist1 y la migración celular fueron reportados en células de válvulas cardíacas (Lee and Yutzey, 2011), y en células de hepatocarcinomas (Matsuo et al., 2009). Por otro lado, en células trofoblásticas Twist1 promueve la sincialización (Lu et al., 2016) y su déficit en células trofoblásticas extravelosas puede afectar la capacidad invasiva produciendo aborto, restricción del crecimiento intrauterino o preeclampsia (Ng et al., 2012)

Twist1 es regulado por múltiples vías de señalización como Notch/STAT3/Twist1, Wnt/ β -catenina/Twist1 y TNF- α /NF κ B/Twist1, dependiendo del contexto tisular (Figura

10). Las proteínas Smad regulan la transcripción de Twist1 a través de estímulos provenientes de la membrana plasmática, como la unión del ligando TGF- β , activando un complejo de receptores que translocan al núcleo. Además, los niveles de Twist1 pueden ser regulados por modificaciones post-traduccionales a través de distintas vías como la activación de Ras o la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), aumentando significativamente la fosforilación de Twist1 y evitando su ubiquitinación y degradación (Zhao et al., 2017).

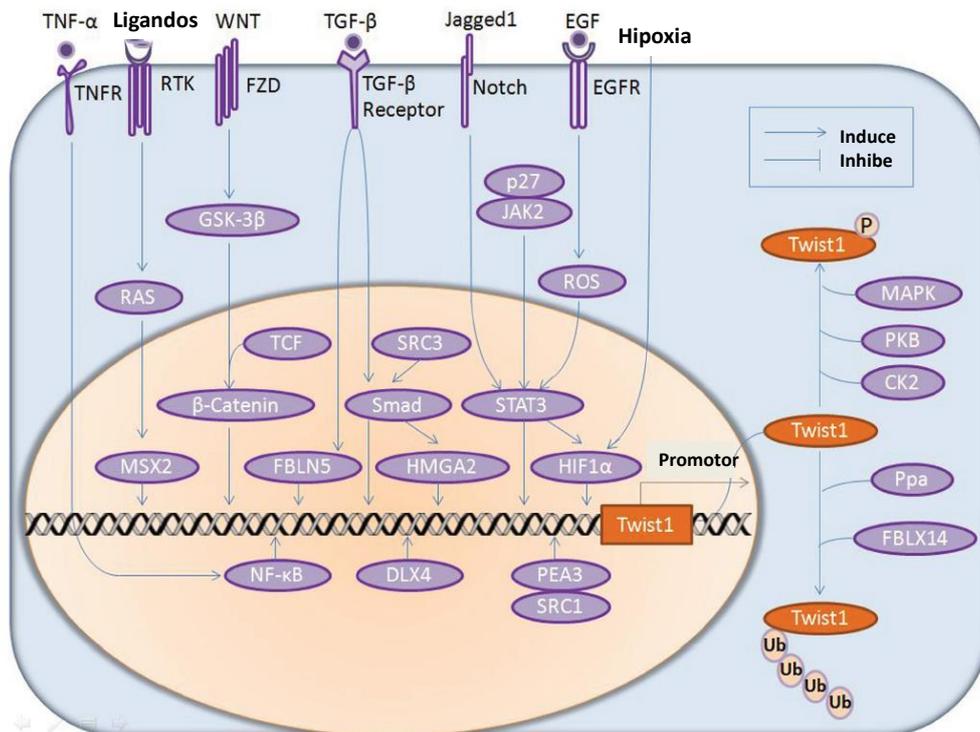


Figura 10: Modulación de la expresión de Twist1 a nivel del gen y de la estabilidad de su proteína. Los insultos extracelulares (tales como TNF- α , ligandos RTK, WNT, TGF- β , Jagged1, señalamiento por EGF e hipoxia) son traducidos a nivel de la célula a través de receptores trans-membrana (TNFR, RTK, FZD, TGF- β , Notch y EGFR) y mediadores intracelulares en el citosol (MAPK, AKT) y núcleo (NF- κ B, MSX2, β -catenina, FBLN5, Smad, HMGA2, STAT3 y HIF-1 α), regulando la expresión de Twist1 a nivel del gen y la estabilidad a nivel de la proteína Twist1. P, fosforilación; Ub, Ubiquitinación; RTK, receptores tirosin-quinasas; EGF, factor de crecimiento epidérmico; FZD, frizzled; GSK-3 β , glicógeno sintasa quinasa 3 β ; TCF, factor de transcripción; JAK2, janus quinasa 2. Adaptada de Zhao et al., 2017, (Zhao et al., 2017).

5. Las células placentales como modelo de estudio

La migración e invasión del trofoblasto a través de la decidua y las arterias espiraladas maternas son eventos cruciales en la placentación. Durante este proceso el trofoblasto invasivo reemplaza las células endoteliales uterinas haciendo los vasos más permisivos para facilitar un adecuado flujo sanguíneo al feto en crecimiento. Fallas en la placentación resultan a partir de una invasión más extensa o inadecuada que causan complicaciones del embarazo como la pre-eclampsia, retardo en el crecimiento uterino, placenta creta, enfermedad trofoblástica gestacional y aún muerte materna o fetal. Un gran número de factores de crecimiento, angiogénicos y proteasas que controlan la migración celular han sido identificados, principalmente usando explantos de placenta o líneas celulares derivadas de trofoblasto como JEG-3, BeWo y HTR-8/SVneo (Knofler, 2010). Las GJIC también juegan un rol crítico regulando el flujo sanguíneo uterino, contribuyendo así a la respuesta adaptativa del embarazo (Winterhager and Kidder, 2015). Se ha demostrado que las Cxs son requeridas para una correcta placentación. Se reportó que mujeres con pérdida recurrente de embarazos tempranos así como con endometriosis exhiben niveles reducidos de Cx43 en la decidua (He and Chen, 2016; Nair et al., 2011). La Figura 11 muestra diferentes Cxs que caracterizan las distintas poblaciones celulares de la placenta humana. Cx43 es un regulador clave en la fusión del citotrofoblasto a sincitiotrofoblasto. Cx40 participa en la proliferación del trofoblasto extraveloso.

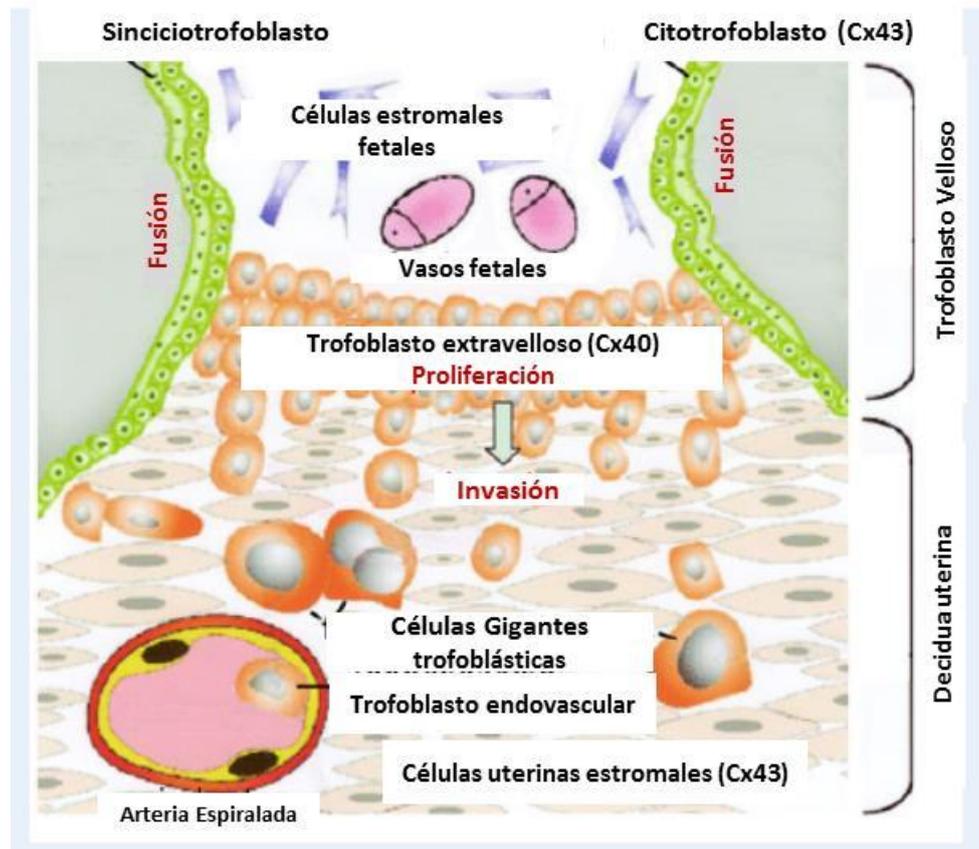


Figura 11. Diferentes conexinas caracterizan las poblaciones celulares de la placenta humana. El dibujo representa un vello de anclaje unido a la decidua materna con el citotrofoblasto, sinciotrofoblasto y el trofoblasto extravelloso de las células columnares junto a las células gigantes. Adaptada de Winterhager y Kidder., 2015, (Winterhager and Kidder, 2015).

5.1 Construcción de la hipótesis de trabajo

Como se mencionó, trabajos previos del laboratorio a través de un ensayo de expresión diferencial de genes, realizado en células trofoblásticas JEG-3, demostraron que el silenciamiento de *StarD7* conduce a la alteración en la expresión de un gran número de transcritos (Tabla II). Uno de los transcritos que se encuentra marcadamente disminuido frente al silenciamiento de *StarD7*, es el transcritos que codifica a la proteína transmembrana Cx43. Considerando los antecedentes expuestos que señalan la participación de Cx43 en los procesos celulares de migración, proliferación y diferenciación celular (Ribeiro-Rodrigues et al., 2017) se planteó como hipótesis de trabajo que ***StarD7 es requerida para mantener la expresión de Cx43 contribuyendo a modular los eventos de migración celular y que niveles disminuidos de la proteína StarD7 conducen a una desregulación en la homeostasis celular.***

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo general:

Establecer el rol de la expresión endógena de StarD7 sobre la expresión y participación de Cx43 en la migración celular polarizada usando como modelo de estudio la línea celular derivada de trofoblasto extravellado HTR-8/SVneo, la cual exhibe un marcado fenotipo migratorio e invasivo.

Objetivos específicos:

- ✓ Analizar el impacto del silenciamiento de StarD7 en la expresión proteica de Cx43.
- ✓ Establecer la contribución de StarD7 en la expresión de proteínas asociadas a matriz extracelular
- ✓ Determinar el efecto del silenciamiento de StarD7 sobre la morfología del aparato de Golgi y el centro organizador de microtúbulos.
- ✓ Establecer si la restauración de los niveles de StarD7.I y Cx43 en las células silenciadas permite recuperar el fenotipo celular.

RESULTADOS

I. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE StarD7 SOBRE LA EXPRESIÓN DE CONEXINA 43

La disminución de StarD7 reduce la expresión de Conexina 43

Como se mencionó en la introducción, la disminución de los niveles de la proteína transportadora de lípidos StarD7 en células JEG-3 produce una regulación negativa en los niveles del transcripto que codifica a la proteína Cx43. A los fines de analizar la relación entre StarD7, Cx43 y migración se empleó como modelo las células HTR-8/SVneo las cuales poseen un perfil migratorio e invasivo. La expresión de StarD7 se silenció mediante transfección con 50 nM del siRNA dirigido contra StarD7 (siD7) durante 72h, utilizando como control un siRNA inespecífico o “scrambled” (siC). El grado de silenciamiento se analizó mediante la valoración del transcripto de StarD7 a través de qRT-PCR y los niveles de la proteína mediante ensayos de Western blot. Se observó que siD7 conduce a una disminución significativa ($80 \pm 2\%$) tanto en el transcripto de StarD7 como en su expresión proteica (Figura 12).

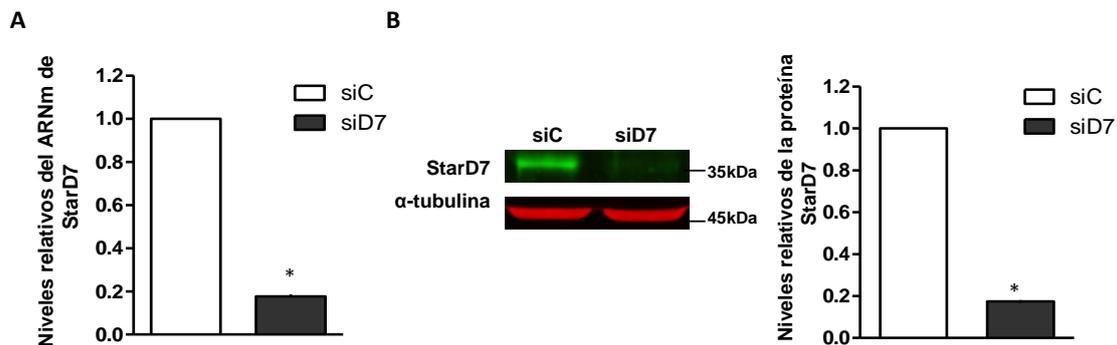


Figura 12. Expresión de StarD7 en células HTR-8/SVneo transfectadas con siD7 o siC. A) La expresión del transcripto StarD7 se determinó mediante transcripción reversa seguida de PCR en tiempo real (qRT-PCR). Se grafica los niveles relativos del transcripto StarD7 respecto al control siC (normalizados con ciclofilina A). B) Los niveles de la proteína StarD7 se analizaron por ensayos de Western blot. A la izquierda se muestra un ensayo representativo y a la derecha la cuantificación densitométrica de los niveles relativos de la proteína StarD7 respecto al control normalizados con α -tubulina. La barra indica la media \pm error estándar de la media (SEM) de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$ one sample t-test).

Paralelamente, se determinaron los niveles del transcripto de Cx43 en las células HTR-8/SVneo que fueron transfectadas con siD7 o con siC. La Figura 13 demuestra que la disminución de StarD7 conduce a una disminución significativa ($30\% \pm 6\%$) en los niveles del transcripto de Cx43 respecto a las células transfectadas con el siC, cuantificados mediante qRT-PCR.

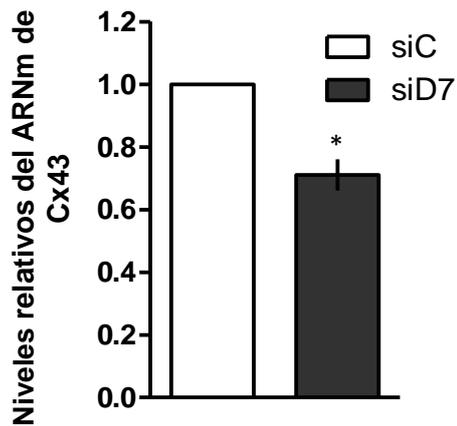


Figura 13. El silenciamiento de StarD7 en células HTR-8/SVneo afecta la expresión de Cx43. La expresión del transcrito de Cx43 se analizó mediante qRT-PCR. El gráfico representa los niveles relativos del transcrito de Cx43 en las células transfectadas con siD7 respecto a las células transfectadas con siC (normalizado con ciclofilina A) en tres experimentos independientes (* $p < 0,05$ one sample t-test).

Además, se observó que la reducción del transcrito de Cx43 se acompaña con una disminución significativa en la cantidad de su proteína ($40\% \pm 8\%$). Los ensayos de Western blot permitieron detectar tres bandas proteicas indicando diferente grado de fosforilación de Cx43, correspondiente a la isoforma de 43kDa, como fue previamente reportado (Laird, 2006; Solan and Lampe, 2009) (Figura 14A). Es importante señalar que no se detectaron las diferentes isoformas de Cx43 de menor peso molecular descritas. Por otro lado, ensayos de inmunofluorescencia demostraron una abundante inmunotinción para Cx43 en las células transfectadas con el siRNA control. Por el contrario, la señal para Cx43 en las células transfectadas con siD7 mostró una significativa reducción, confirmando los resultados obtenidos a partir de los análisis de Western blot (Figura 14B).

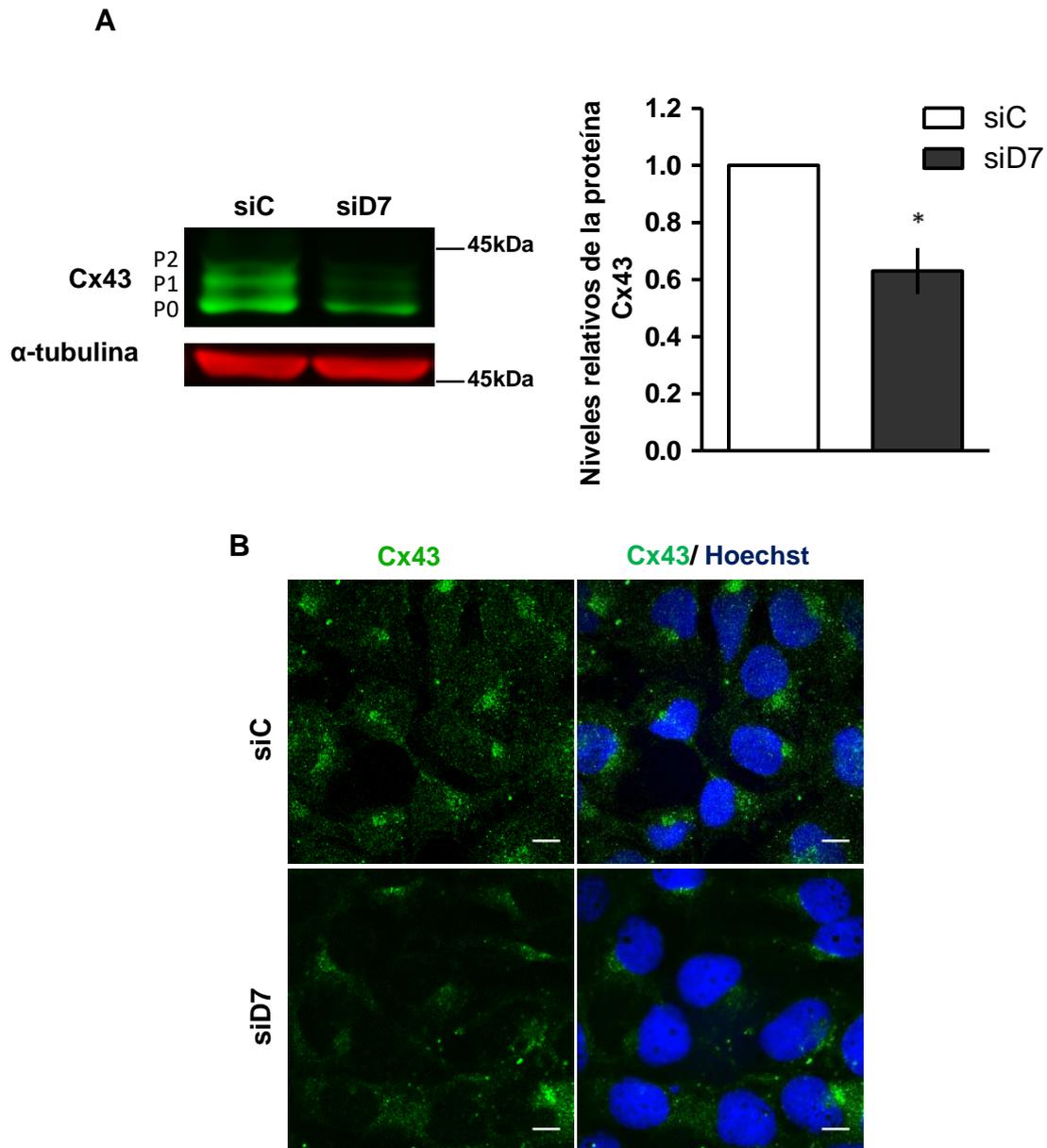


Figura 14. El silenciamiento de StarD7 en células HTR-8/SVneo afecta la expresión de Cx43.
A) La expresión de la proteína Cx43 se analizó mediante ensayos de Western blot. Se muestra un ensayo representativo realizado a partir de extractos proteicos provenientes de células transfectadas con siD7 o siC. Se muestra el análisis densitométrico de tres experimentos independientes (*p<0,05 one sample t-test). La barra indica la media \pm error estándar de la media (SEM). **B)** Microscopía de epifluorescencia. Inmunodetección de Cx43 (verde) y tinción de los núcleos con Hoechst. A la derecha se muestra la superposición de los dos canales. Barra= 10 μ m.

II. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE StarD7 SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR (ECM) Y ASOCIADAS A ÉSTAS

La disminución de StarD7 en células HTR-8/SVneo incrementa los niveles de transcritos y de proteínas de ECM y de proteínas asociadas a ECM

Como se mencionó, se ha reportado la participación de Cx43 en la regulación de la expresión de genes involucrados en distintos procesos celulares (Iacobas et al., 2012). En este sentido, se demostró la capacidad de Cx43 de translocar al núcleo y de interactuar con factores de transcripción (Kotini et al., 2018). Considerando que cambios en la expresión de Cx43 se correlacionan con modificaciones en los niveles de transcritos que codifican a proteínas de matriz extracelular (ECM) así como de proteínas asociadas a ECM (Esseltine et al., 2015), resultó de interés analizar si la reducción de los niveles de StarD7 también conduce a modificaciones en la expresión de genes de ECM y de proteínas asociadas a ECM. Para tal fin, se evaluaron los niveles de los transcritos ITGA1, ITGA5, e ITGB1 que codifican a las proteínas integrina α 1, integrina α 5 e integrina β 1, respectivamente. Las integrinas son heterodímeros compuestos por dos subunidades (α y β) no covalentemente unidas que actúan como nexo entre la ECM y el citoesqueleto. Participan en la organización del citoesqueleto y la transducción de señales regulando numerosas funciones celulares. Se asocian a proteínas de la ECM conectando el medio ambiente extracelular con el intracelular (Kadry and Calderwood, 2020).

Además, se evaluó el transcrito NID1 que codifica a la glicoproteína nidogen-1 la cual se une a laminina-1 y colágeno tipo IV formando un complejo ternario, que estabiliza y mantiene la estructura de la membrana basal (Fox et al., 1991).

Los resultados muestran un aumento significativo en los niveles de los ARNm de ITGA1, ITGA5, ITGB1 y NID1 en las células transfectadas con siD7 respecto a las células transfectadas con siC (Figura 15).

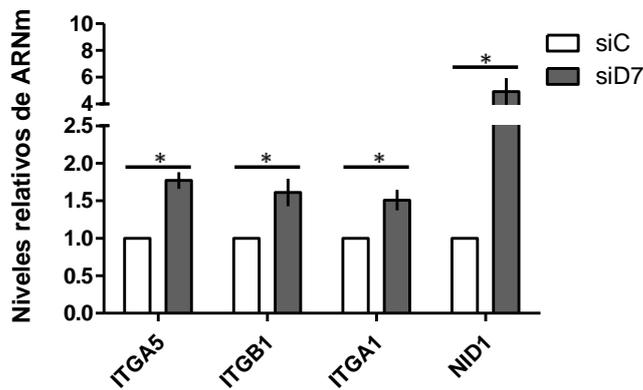


Figura 15: El silenciamiento de StarD7 incrementa la expresión de ARNm de ITGA5, ITGB1, ITGA1 y NID1. Se determinó los niveles de ARNm mediante qRT-PCR a partir de ARN total de células transfectadas con siC o siD7. El gráfico representa la media y el SEM de los niveles relativos de cada transcrito respecto al control (normalizados con ciclofilina A) de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$ one sample t-test).

El análisis, mediante ensayos de Western blot, de los extractos totales de las células transfectadas con siD7 reveló un aumento significativo de los niveles de las proteínas integrina $\alpha 5$, integrina $\beta 1$ madura (integrina N-glicosilada en el aparato de Golgi) y nidogen-1 respecto a siC (Figura 16A y B). Además se detectó un aumento significativo de la proteína β -catenina, no así de su transcrito.

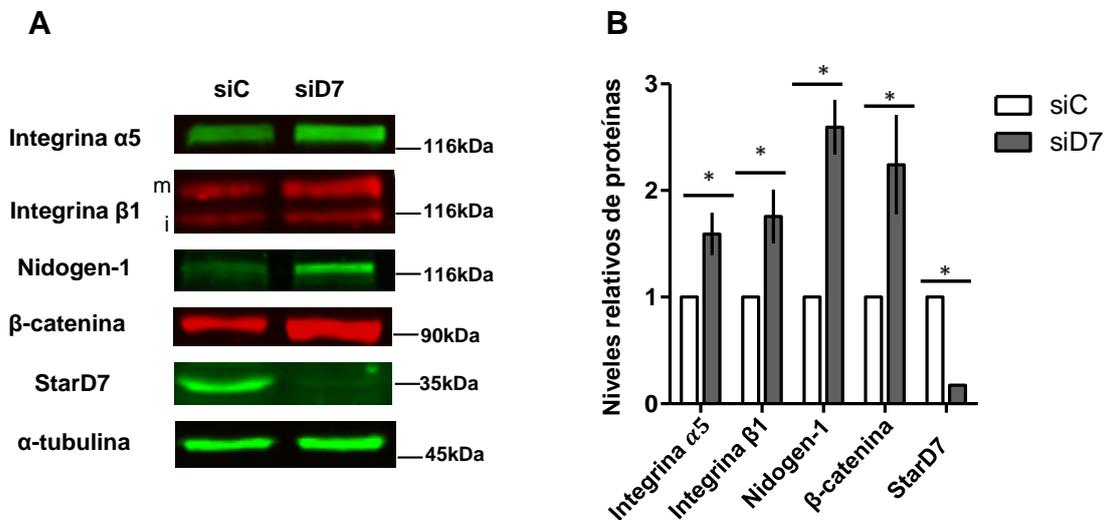


Figura 16: El silenciamiento de StarD7 produce un aumento en los niveles proteicos de integrina $\alpha 5$, integrina $\beta 1$ madura, nidogen-1 y β -catenina. A) Ensayos de Western blot representativos realizados con extractos totales de células transfectadas con siC o siD7. Se utilizaron anticuerpos contra las proteínas integrina $\alpha 5$, integrina $\beta 1$, nidogen-1, β -catenina y StarD7. Se utilizó α -tubulina como control de carga. B) Cuantificación densitométrica de las bandas correspondientes a las proteínas indicadas, normalizadas con la señal de α -tubulina y relativizadas a la condición control considerada 1. Las barras representan la media \pm SEM de los resultados obtenidos en al menos tres experimentos independientes (* $p < 0,05$, one sample t-test).

Cabe señalar que el anticuerpo dirigido contra integrina $\alpha 1$ disponible no permitió reconocer la proteína mediante ensayos de Western blot, sin embargo, fue capaz de detectarla en ensayos de inmunofluorescencia. La Figura 17 muestra la inmunotinción obtenida para integrina $\alpha 1$ e integrina $\alpha 5$ en células HTR-8/SVneo transfectadas con siC o siD7. Este análisis indica que el silenciamiento de StarD7 conduce a un aumento en la expresión de ambas integrinas en las células silenciadas respecto a las células transfectadas con el siC, confirmando lo observado en los ensayos de Western blot para integrina $\alpha 5$.

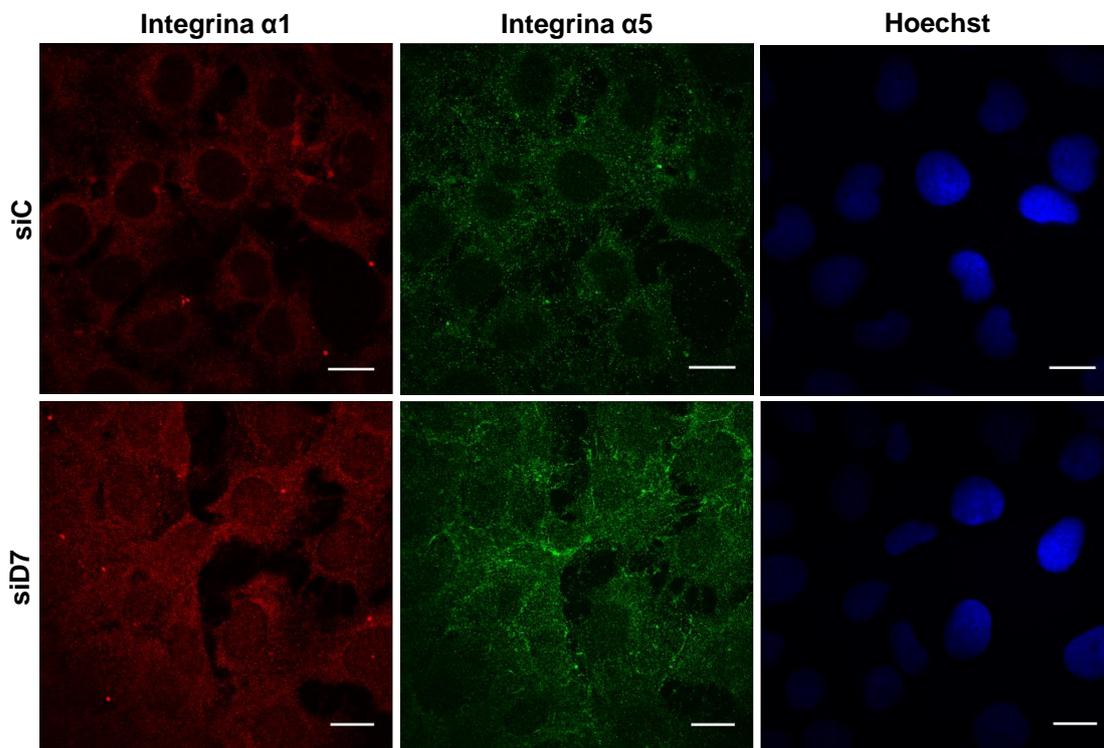


Figura 17: Inmunodetección de integrina $\alpha 1$ (rojo) e integrina $\alpha 5$ (verde) realizada en células HTR-8/SVneo transfectadas con siC o siD7. Los núcleos se tiñeron con Hoechst (panel derecho). Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal. Barra= 20 μ m.

La disminución de StarD7 en células HTR-8/SVneo conduce a un aumento en la actividad de la metaloproteasa 9

Se ha reportado que la deficiencia de Cx43 facilita la expresión de transcritos que codifican a proteínas que forman la matriz extracelular como colágeno tipo I, tipo III y MMP-2, entre otras (Cogliati et al., 2015). En base a este reporte, resultó de interés evaluar en células HTR-8/SVneo transfectadas con siC o siD7 la actividad de las metaloproteasas MMP2 y MMP9. Las metaloproteasas son endopeptidasas zinc-

dependientes, las cuales tienen afinidad por distintos componentes de la ECM entre los que se encuentran principalmente los diferentes colágenos. Para ello, y con la finalidad de evitar la valoración de las metaloproteasas presentes en el suero, las células transfectadas con siD7 o siC fueron privadas de suero fetal bovino 18h antes de cumplirse las 72h de silenciamiento. Posteriormente, se colectó el sobrenadante y se lo liofilizó con el fin de concentrar las MMPs. La actividad de las MMPs 2 y 9 se analizó mediante zimografía utilizando un gel de poliacrilamida y gelatina, la cual es el principal sustrato de las MMPs 2 y 9. La Figura 18 muestra la corrida de un gel de poliacrilamida y gelatina representativo en donde se observa claramente mayor actividad de la MMP9 en el sobrenadante de las células transfectadas con el siD7 con respecto a las células transfectadas con el siC. No se detectó actividad de la MMP2.

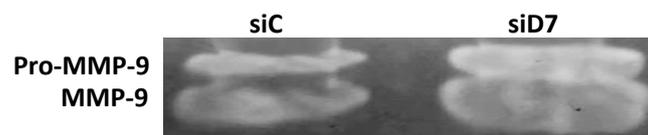


Figura 18: El silenciamiento de StarD7 en células HTR-8/SVneo produce un aumento en la actividad de MMP9. Imagen representativa de un gel de zimografía de sobrenadante de células transfectadas con siC o siD7.

En resumen, en conjunto estos resultados indican que el silenciamiento de StarD7 en las células HTR-8/SVneo conduce a una disminución en los niveles del transcripto de Cx43 y su proteína, que se acompaña con un aumento en los niveles de los transcriptos ITGA1, ITGA5, ITGB1 y NID1. Además, se detectó un aumento en los niveles proteicos de integrina α 1, integrina α 5, integrina β 1 madura, β -catenina y nidogen-1, así como en la actividad de MMP9.

III. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE StarD7 SOBRE LA ADHESIÓN Y MIGRACIÓN CELULAR POLARIZADA

El silenciamiento de StarD7 disminuye la adhesión de las células HTR-8/SVneo a fibronectina

Se demostró previamente que el silenciamiento de StarD7 en las células HTR-8/SVneo conduce a un aumento en la expresión de las proteínas transmembranas: integrina $\alpha 5$, integrina $\beta 1$ madura e integrina $\alpha 1$. Como se mencionó, las integrinas forman una familia de proteínas que actúan como receptores de la adhesión celular interaccionando con proteínas de la ECM y conectando el medio ambiente extracelular con el intracelular y viceversa. Las integrinas reconocen y se unen con diferente afinidad a distintos ligandos extracelulares, siendo el principal ligando del heterodímero $\alpha 5 \beta 1$: la fibronectina (Campbell and Humphries, 2011). Con el objetivo de analizar si el silenciamiento de StarD7 en las células HTR-8/SVneo afecta la adhesión celular se realizaron ensayos de adhesión sobre una superficie recubierta con fibronectina (Humphries, 2009). Para ello, las células HTR-8/SVneo se transfectaron con siD7 o siC durante 72h. Posteriormente, se replaquearon aproximadamente 15.000 células sobre una superficie sensibilizada con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fibronectina (ver materiales y métodos), registrándose inmediatamente imágenes de la placa mediante microscopía de contraste de fase cada 30 segundos, durante 15 minutos. La Figura 19 muestra imágenes representativas de resultados preliminares obtenidas a partir de 30 células por condición. A idénticos tiempos de replaqueo las células silenciadas con siD7 se extienden (“spreading”) menos que las células transfectadas con siC, cubriendo una superficie menor de la placa recubierta de fibronectina. Estos resultados, contrariamente a lo esperado, indican que si bien las células transfectadas con siD7 expresan mayor cantidad de las integrinas $\alpha 1$, $\alpha 5$ y $\beta 1$ madura, poseen menor afinidad de adhesión a la superficie de fibronectina que las células transfectadas con siC. Al presente no tenemos una explicación, pero una posibilidad podría ser que las integrinas no se localicen correctamente en la membrana plasmática o alternativamente ocurra una falla en el proceso de activación del dímero de integrina requerido para el reconocimiento del ligando (Takagi et al., 2001).

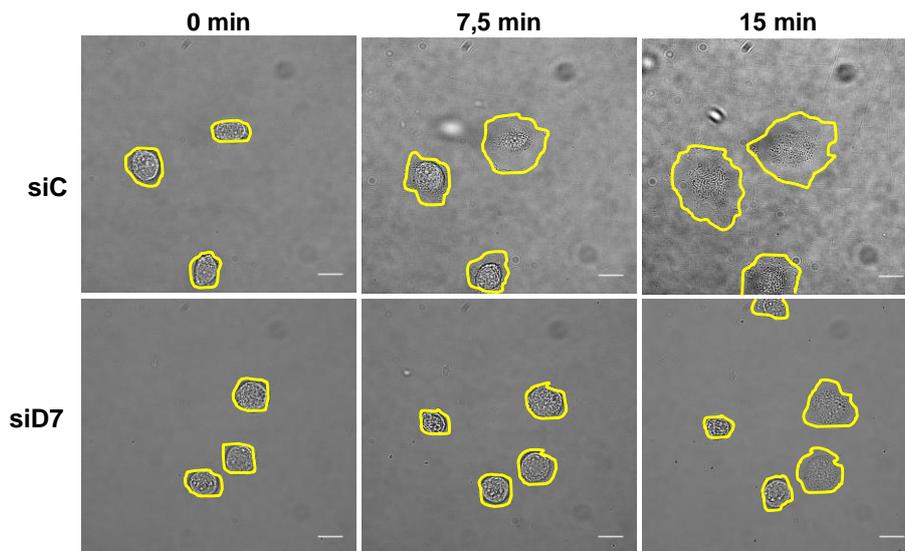


Figura 19. El silenciamiento de StarD7 en células HTR-8/SVneo conduce a una menor adhesión celular. A) Se muestran imágenes representativas obtenidas a 0; 7, 5 y 15 min posteriores al replaqueo de las células previamente transfectadas durante 72h con siC o siD7. Las imágenes se registraron por microscopía de contraste de fase. Los bordes de las células se marcan en cada foto con una línea amarilla. Barra= 20 μ m

El silenciamiento de StarD7 disminuye la migración celular polarizada en las células HTR-8/SVneo

Posteriormente, se evaluó si la disminución en los niveles de StarD7 compromete la migración de células con un fenotipo migratorio como las HTR-8/SVneo. Para ello, se analizó la migración de las células transfectadas con siD7 respecto a las células transfectadas con siC mediante un ensayo de reparación de la herida (wound healing). Este ensayo consiste en generar una herida en una monocapa de células confluentes y posteriormente analizar la capacidad de las células para reparar la herida. Para tal fin, se realizaron heridas de tamaño similar en monocapas de células HTR-8/SVneo previamente transfectadas con siD7 o siC durante 72h. La Figura 20A muestra imágenes representativas de diez heridas diferentes registradas al inicio del ensayo (tiempo=0) y después de 8h. Se observó que las células transfectadas con el siD7 migran más lentamente que las células transfectadas con el siC. El análisis cuantitativo de dos experimentos independientes se muestra como porcentaje de la herida remanente (Figura 20B).

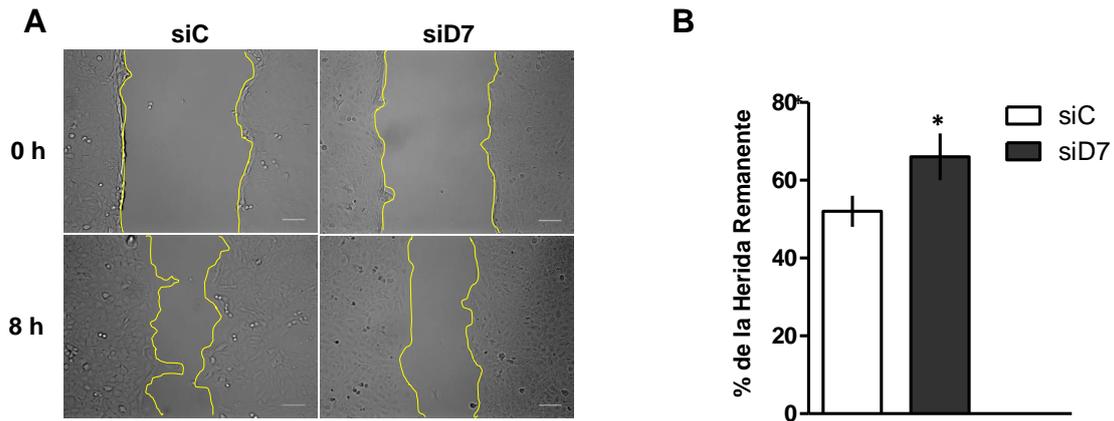


Figura 20. El silenciamiento de StarD7 en células HTR-8/SVneo conduce a una disminución en la migración celular polarizada. A) Se muestran imágenes representativas de al menos diez heridas registradas por microscopía de contraste de fase a las 0h y 8h (barra= 20 μ m). Los bordes de las heridas se marcan en cada foto con una línea amarilla. **B)** Porcentaje del área remanente respecto al área inicial, * $p < 0,05$ en comparación con las células transfectadas con siC. Las barras indican la media y el SEM de dos experimentos independientes. (* $p < 0,05$, one sample t-test).

El silenciamiento de StarD7 produce disminución en los niveles de Twist1

Como se explicó en la introducción, entre las múltiples moléculas involucradas en el proceso de migración celular se destaca el factor de transcripción Twist1, conocido como uno de los reguladores maestros del proceso de transición epitelio mesenquimal (Khan et al., 2013). Considerando que su disminución está relacionada a una disminución en la migración e invasión celular (Wang et al., 2017), resultó de interés analizar la expresión de Twist1 en las células HTR-8/SVneo con StarD7 silenciado. Experimentos de Western blot realizados a partir de extractos proteicos provenientes de células transfectadas con siD7 o siC muestran una significativa disminución en la expresión de Twist1 en las células silenciadas con el siD7 respecto a las células tratadas con el siC (Figura 21A). La cuantificación de cuatro experimentos independientes se muestra en la Figura 21B.

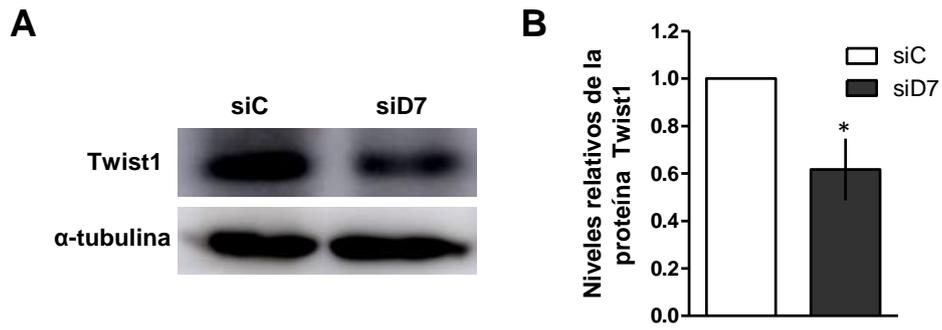


Figura 21. El silenciamiento de StarD7 produce una disminución en los niveles proteicos de Twist1. **A)** Ensayos de Western blot representativo realizado con extractos totales de células transfectadas con siC o siD7. Se utilizó α -tubulina como control de carga. **B)** Cuantificación densitométrica de las bandas correspondientes normalizadas con la señal de α -tubulina y relativizadas a la condición control considerada 1. La barra representa la media \pm SEM de los resultados obtenidos de cuatro experimentos independientes (* $p < 0,05$, one sample t-test).

En resumen, estos resultados indican que la disminución de StarD7 conduce a una menor adhesión y migración celular que podría estar asociada a una disminución en la expresión de Twist-1.

IV. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE StarD7 SOBRE LA MORFOLOGÍA DEL APARATO DE GOLGI Y LA LOCALIZACIÓN DEL CENTRO ORGANIZADOR DE MICROTÚBULOS (MTOC)

La disminución de StarD7 en células HTR8/ SVneo produce disrupción del aparato de Golgi.

El aparato de Golgi es una organela esencial para el procesamiento, distribución y transporte vesicular de proteínas. Como se mencionó, numerosos reportes señalan la importancia del posicionamiento e integridad del Golgi durante la migración celular polarizada (Kupfer et al., 1982; Mellor, 2004; Yadav et al., 2009). Considerando que el silenciamiento de StarD7 conduce a una disminución en la migración celular, resultó de interés evaluar la integridad del aparato de Golgi. Para ello, se analizó la morfología del Golgi mediante ensayos de inmunofluorescencia. Se utilizaron anticuerpos dirigidos contra las proteínas GM130 y golgina 97, residentes en el cis-Golgi y trans-Golgi, respectivamente. La Figura 22A muestra que la distribución de la señal observada para ambas proteínas en las células HTR-8/SVneo silenciadas con siD7 es diferente respecto a las células tratadas con el siRNA control. La marcación de GM130 y golgina 97 se localizó en forma condensada y perinuclear en las células control, mientras que en las células transfectadas con siD7 la señal se localizó con un perfil puntiforme alrededor del núcleo y dispersada en el citoplasma, indicando una fragmentación del aparato de Golgi. La cuantificación de las células que presentaron el aparato de Golgi fragmentado indica que sólo el 20% de las células controles exhibían el Golgi fragmentado comparado al 50% observado en las células transfectadas con el siD7 (Figura 22B). Estos resultados muestran que la transfección de las células con siD7 genera una mayor fragmentación del aparato de Golgi.

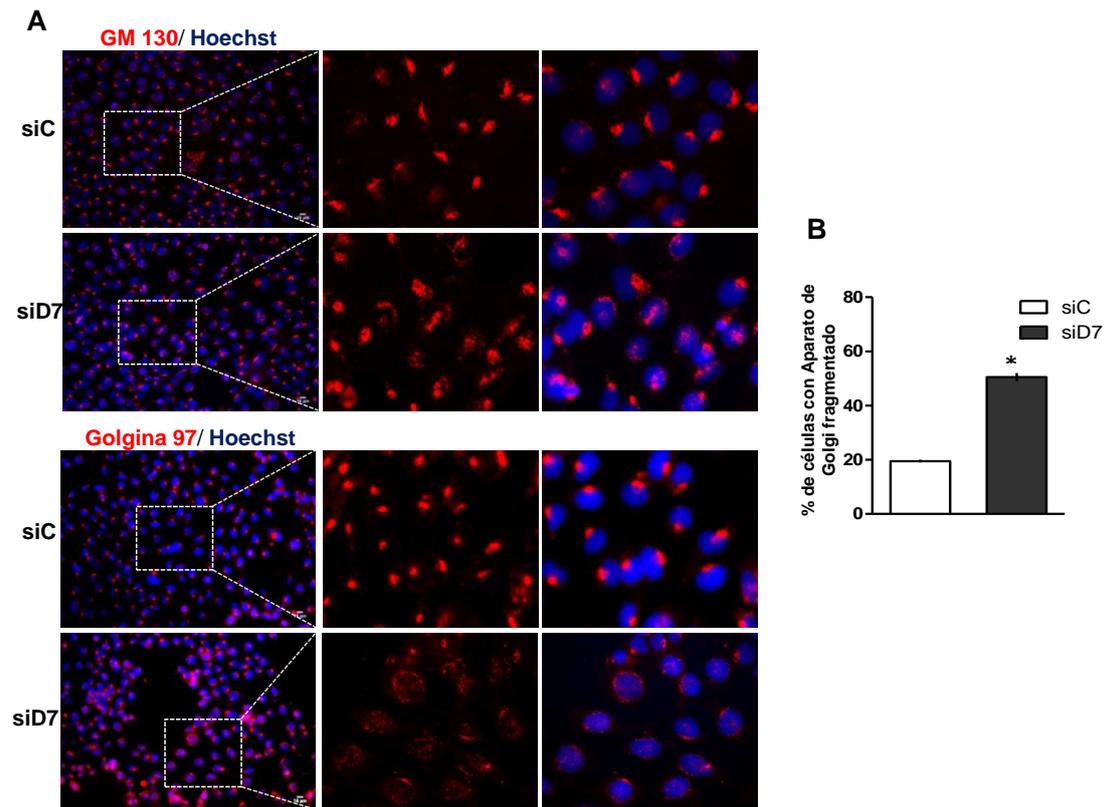


Figura 22. La disminución de StarD7 produce una mayor fragmentación del aparato de Golgi. **A)** Imágenes representativas de inmunofluorescencia de GM130 y golgina 97 en células HTR-8/SVneo silenciadas con siD7 o siC durante 72h. En rojo se muestra la marcación con anti-GM130 y anti-golgina 97 y en azul los núcleos teñidos con Hoechst. A la derecha se muestra la imagen ampliada de cada condición. **B)** El gráfico de barras representa el porcentaje de células que exhiben el aparato de Golgi alterado (media \pm SEM, n=2, *p< 0,05, one-sample t-test). El aparato de Golgi se consideró fragmentado cuando la señal de GM130 o golgina 97 se distribuyó en más de una cuadrante de los cuatro cuadrantes iguales en los que se dividió el núcleo. Se analizaron 750 células.

El silenciamiento de StarD7 en las células HTR-8/SVneo no modifica la integridad de la red de las fibras de actina

El aparato de Golgi contribuye a la regulación de una serie de procesos celulares actuando directa o indirectamente a través de proteínas de anclaje a la membrana, como las golginas y las proteínas GRASP que se encuentran en las membranas del aparato de Golgi (Kulkarni-Gosavi et al., 2019). Estas proteínas de anclaje interactúan directamente con el citoesqueleto de actina y microtúbulos influenciando la morfología del aparato de Golgi. Considerando que la interacción del Golgi con las fibras de actina y los microtúbulos es esencial para mantener su estructura (Egea et al., 2013), se evaluó la integridad de las fibras de actina en las células silenciadas para

StarD7. Para ello, células HTR-8/SVneo transfectadas con siD7 o siC durante 72h se tiñeron con faloidina unida a Alexa fluor 546, que marca las fibras de actina. Las imágenes registradas mediante microscopía confocal no muestran diferencias en la red del citoesqueleto formada por las fibras de actina en las células transfectadas con siD7 respecto a las células tratadas con siC (Figura 23). Este resultado sugiere que el cambio morfológico observado en el aparato de Golgi en las células HTR-8/SVneo transfectadas con siD7 no depende de modificaciones en las fibras de actina del citoesqueleto.

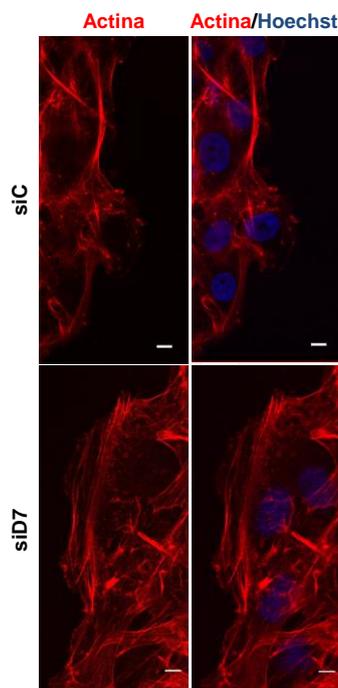


Figura 23. El silenciamiento de StarD7 no afecta la integridad de las fibras de actina. Imágenes de microscopía confocal de células transfectadas con siC o siD7 durante 72h. Los filamentos de actina fueron teñidos con faloidina Alexa fluor 546 (rojo) y los núcleos con Hoechst (azul). Barra = 10 μ m.

El silenciamiento de StarD7 en las células HTR-8/SVneo altera la localización del MTOC

Numerosas publicaciones indican que tanto el aparato de Golgi como el MTOC participan activamente en el movimiento celular polarizado (Kupfer et al., 1982; Raman et al., 2018; Rios, 2014; Sutterlin and Colanzi, 2010). Por otro lado, considerando que varios reportes indican que la deficiencia de Cx43 causa defectos en la polaridad celular por falla en la reorientación del aparato de Golgi y del MTOC durante la migración polarizada (Francis et al., 2011; Rhee et al., 2009; Xu et al., 2006) se procedió a evaluar el efecto del silenciamiento de StarD7 sobre la localización del

MTOC durante la migración celular. Para ello se realizaron ensayos de reparación de la herida (wound healing) en células HTR-8/SVneo silenciadas con siD7 o siC. Se analizó la localización del MTOC mediante inmunofluorescencia usando un anticuerpo dirigido contra γ -tubulina, proteína integral del MTOC. La Figura 24A muestra imágenes representativas de la inmunotinción. Se observa claramente que las células silenciadas con el siC poseen el MTOC orientado en dirección al frente de la migración, mientras que las células transfectadas con el siD7 el MTOC se localizó al azar, no alineado en la dirección del cierre de la herida. Se consideró que las células que tenían su MTOC dentro de un ángulo de 120° con respecto al frente de migración tenían el MTOC correctamente localizado, mientras que las células que presentaban su MTOC fuera del ángulo de 120° tenían una migración alterada (Figura 24B). Los resultados indican que el 50% de las células transfectadas con el siC tenían el MTOC reorientado hacia el frente de la herida, mientras que solo el 35% de las células transfectadas con el siD7 exhibían el MTOC en la orientación correcta, hacia el frente de migración (Figura 24C).

Se concluye que la disminución de StarD7 en las células HTR-8/SVneo produce disrupción del aparato de Golgi y alteración en la localización del MTOC durante la migración celular, lo cual conduciría a una disminución en la migración celular polarizada.

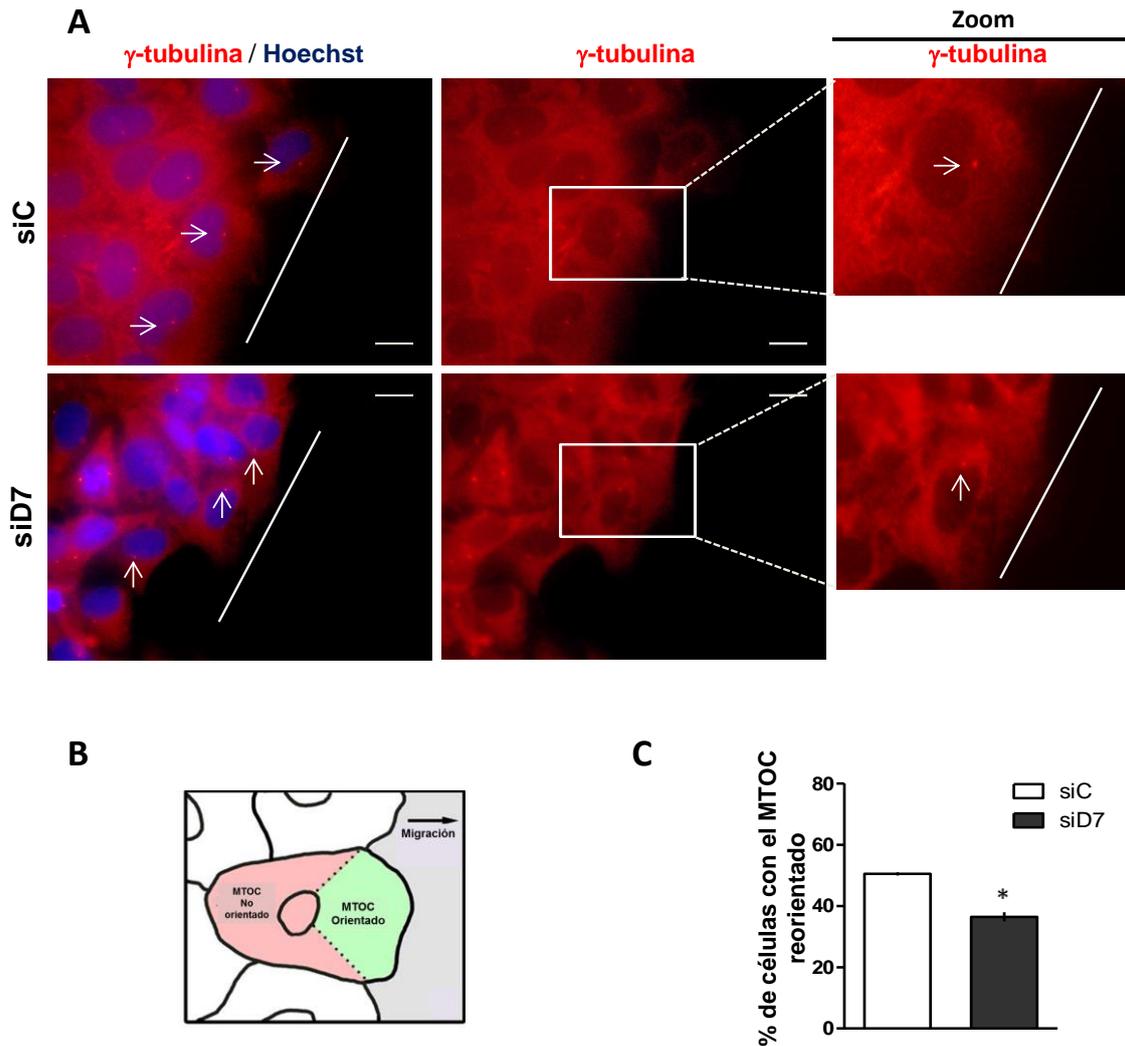


Figura 24. La disminución de StarD7 afecta la localización del centro organizador de microtúbulos durante la migración celular. A) Ensayo de la herida realizado sobre monocapa de células transfectadas con siC o siD7 durante 72h (ver materiales y métodos). El MTOC se detectó mediante inmunotinción con anti- γ -tubulina (flechas blancas); los núcleos se tiñeron con Hoechst. Las líneas blancas marcan el borde de la herida y los recuadros blancos indican las zonas de la imagen que se ampliaron a la derecha de la figura. Barra = 20 μ m. **B, C)** La orientación del MTOC se registró en cada célula, la cual se dividió en un sector de 120 grados frente al borde de la migración y un segundo sector que comprendió los 240 grados restantes. Las células con MTOC ubicados frente al borde de la migración se consideraron orientadas y se registraron con un puntaje igual a 1, las células con MTOC posicionados fuera de este sector se consideraron no orientadas y se registraron con un puntaje igual a "0". **C)** Porcentaje de MTOC reorientado obtenido a partir de 450 células situadas en el borde de la herida en cada experimento (media \pm SEM, n=2, *p< 0,05, one sample t-test).

V. EFECTO DE LA RECUPERACIÓN DE LOS NIVELES DE STARD7 O CONEXINA 43 EN LAS CÉLULAS SILENCIADAS

La expresión exógena de StarD7 en células HTR-8/SVneo silenciadas restaura los niveles de Cx43 y nidogen-1

A los fines de confirmar que los efectos observados por el silenciamiento con siRNA son específicos, se realizaron ensayos de restauración de los niveles de StarD7 en las células silenciadas con siD7. Para ello, células silenciadas con el siD7 durante 56h se transdujeron con partículas virales que expresan la proteína StarD7.I (generadas a partir del vector lentiviral pLentiStarD7.I) y se cultivaron hasta completar las 90h. De manera similar, células silenciadas con el siC durante 56h se transdujeron con partículas virales generadas a partir del vector pLenti vacío. Los resultados del ensayo muestran que la recuperación de los niveles de StarD7 produce la restauración de los niveles proteicos de Cx43 y nidogen-1 alcanzando niveles similares a los observados en las células control (Figura 25). Es importante destacar que las células silenciadas con el siC y transducidas con partículas virales que contienen el vector pLenti vacío no modificaron la expresión de Cx43 y nidogen-1, indicando que las partículas virales per se, no generan ningún efecto en la expresión de las proteínas ensayadas. Estos resultados permiten concluir que la alteración en los niveles de Cx43 y nidogen-1 detectados en las células silenciadas contra StarD7 depende específicamente de la disminución de los niveles de StarD7.

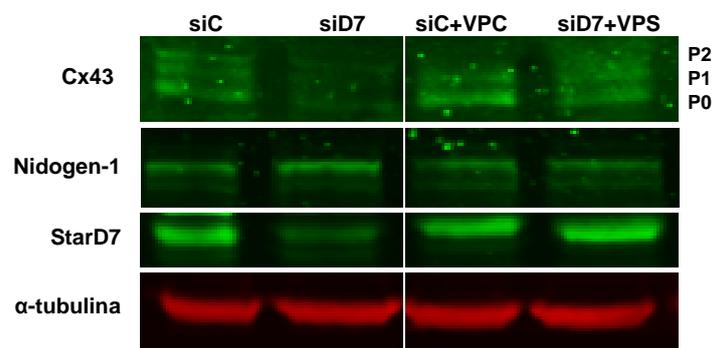


Figura 25. La recuperación de los niveles de StarD7 en células transfectadas con siD7 restableció los niveles de Cx43 y nidogen-1. Ensayos de Western blot, representativo de tres experimentos independientes, realizado con extractos totales de células transfectadas con siC o siD7 durante 56h y posteriormente transducidas con partículas virales que expresan StarD7.I (VPS) o con partículas virales control (VPC) y cultivadas durante 34h. Se utilizó α -tubulina como control de carga.

La expresión exógena de Cx43 en células HTR-8/SVneo silenciadas restaura los niveles de nidogen-1

Con el objetivo de determinar si la recuperación de los niveles de nidogen-1 depende del restablecimiento de los niveles de StarD7 o de la restauración de los niveles de Cx43, se realizaron ensayos de expresión exógena de Cx43. Para tal fin, las células HTR-8/SVneo se transfectaron con siD7 durante 48h. Cumplido este tiempo, se transfectaron con 2,0 µg del vector pLentiCx43-IRES-EGFP (vector clonado en nuestro laboratorio) y se cultivaron hasta completar 90h. Resultados preliminares muestran que la recuperación de los niveles de Cx43 produce la restauración de los niveles proteicos de nidogen-1 a valores similares a los observados en las células control (Figura 26). Estos resultados permitirían inferir que el aumento en los niveles de nidogen-1 detectados en las células silenciadas contra StarD7 depende de la disminución de los niveles de Cx43 e indirectamente de la disminución de StarD7.

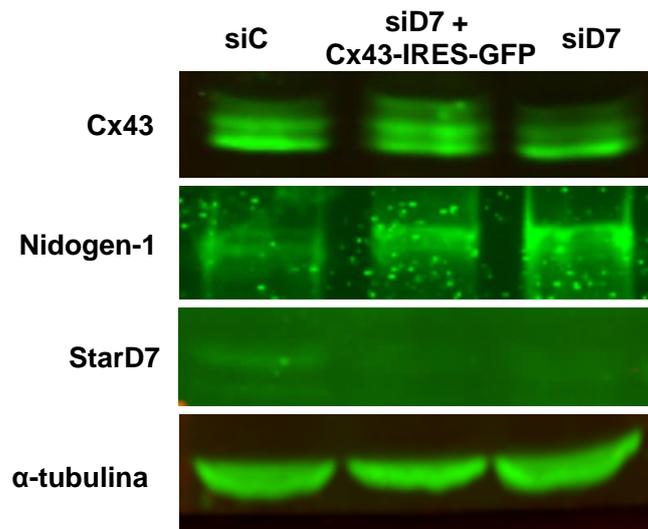


Figura 26. La recuperación de los niveles de Cx43 en células transfectadas con siD7 restableció los niveles de nidogen-1. Ensayo de Western blot realizado con extractos totales de células transfectadas con siC o siD7 durante 48h y posteriormente transfectadas con pLenti Cx43-IRES-EGFP o con pLenti vacío y cultivadas durante 34h. Se utilizó α-tubulina como control de carga.

La expresión exógena de Cx43 en células HTR-8/SVneo silenciadas restablece la migración polarizada

Con el fin de determinar si la reducción en la expresión de Cx43 inducida por el silenciamiento de StarD7 es la responsable de la disminución en la migración de las células HTR-8/SVneo se utilizaron células silenciadas con siD7 durante 48h y posteriormente transfectadas con 2,0 µg del vector pLentiCx43-IRES-EGFP hasta completar las 82h de cultivo. Cumplido este tiempo se realizaron heridas en la monocapa celular y se obtuvieron imágenes mediante microscopía de fluorescencia de las células fluorescentes ubicadas en el borde de la herida durante 8h. Las imágenes obtenidas a partir de un ensayo permitieron analizar la distancia recorrida por las células fluorescentes y no fluorescentes (usadas como control) mediante el programa ImageJ/Tracking. Este resultado preliminar muestra que durante el tiempo analizado, las células con fluorescencia verde, que recuperaron los niveles de Cx43, se desplazaron a mayor distancia que las células no fluorescentes (Figura 27). Este resultado indica preliminarmente que la disminución en la migración celular observada en las células transfectadas con siD7 es dependiente de la reducción en los niveles proteicos de Cx43.

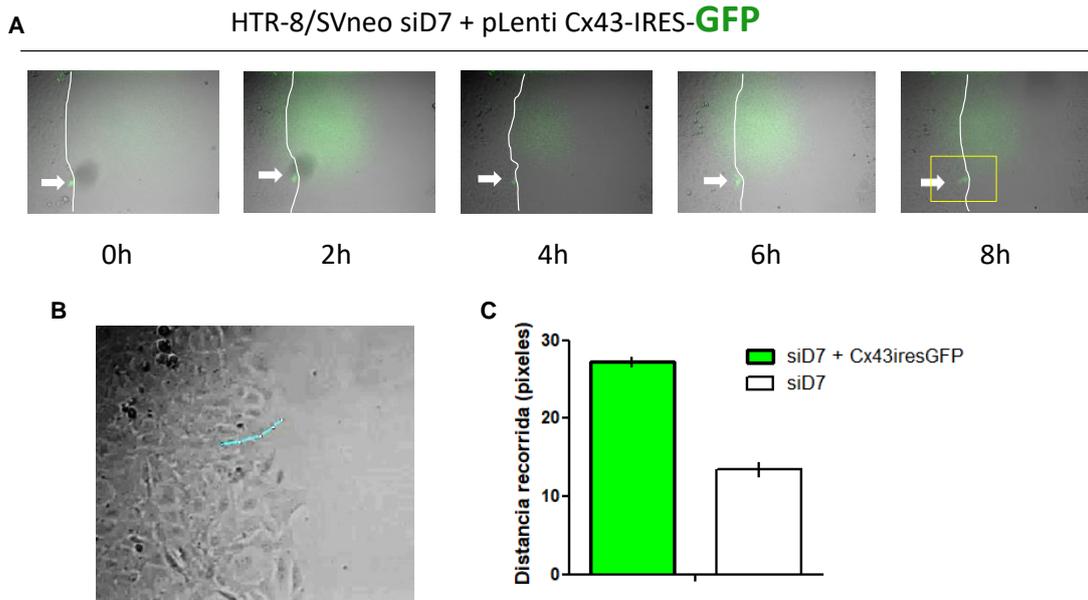


Figura 27. Las células HTR-8/SVneo silenciadas para StarD7 que recuperan los niveles de Cx43 migran más que las células silenciadas. **A)** Ensayo de la herida realizado sobre monocapa de células silenciadas con siD7 y posteriormente transfectadas con pLentiCx43-IRES-EGFP. Se muestran imágenes representativas obtenidas a las 0; 2; 4; 6 y 8 horas después de realizada la herida. La línea blanca en cada imagen indica el frente de migración y flecha blanca indica la célula verde fluorescente. Barra= 20 μ m **B)** Imagen ampliada (recuadro) mostrada en A. La línea celeste muestra el recorrido de la célula fluorescente durante las 8h del ensayo de la herida realizado con el programa ImageJ (Tracking) Barra= 20 μ m. **C)** Cuantificación de la distancia recorrida por las células fluorescentes (n=2), en píxeles, de las células HTR-8/SVneo silenciadas y de las células que recuperaron los niveles de Cx43 (verde). Las barras representan la media \pm SEM.

Discusión

La proteína StarD7 pertenece a la familia de proteínas START, las cuales son LTPs intracelulares involucradas en el transporte no vesicular de lípidos. El transcripto de StarD7, inicialmente identificado en nuestro laboratorio mediante el análisis de expresión diferencial de genes (Durand et al., 2004) codifica a una proteína ubicua, con elevada similitud a genes ortólogos presentes en diferentes genomas sugiriendo que StarD7 tiene una función fisiológica conservada. Al respecto, se ha reportado que StarD7 se localiza en el citosol (Horibata et al., 2017) así como en el espacio intermembranas mitocondrial participando en el transporte de PC desde el RE a la membrana externa mitocondrial y desde la membrana externa a la membrana interna de la mitocondria (Saita et al., 2018).

Como se mencionó, trabajos previos del laboratorio demostraron que el silenciamiento de StarD7 conduce a una disminución en los niveles del transcripto que codifica a la proteína Cx43 (ver Tabla II). Si bien la función más conocida de Cx43 es la de formar canales intercelulares en la membrana plasmática (Gaps), en los últimos años se ha demostrado que Cx43 está presente en otros tipos de comunicación intercelular como en los túneles de nanotubos (TNT) y vesículas extracelulares. Además está ampliamente documentada la función no canónica o independiente de la función de canal que incluye la regulación de diferentes procesos celulares como expresión de genes, proliferación, migración, apoptosis, diferenciación y supervivencia (Kameritsch et al., 2012; Ribeiro-Rodrigues et al., 2017). Conociendo la relevancia de esta proteína en la homeostasis celular y considerando que el silenciamiento de StarD7 en las células trofoblásticas de origen veloso JEG-3 produce, entre otros efectos, una disminución en la migración celular (Flores-Martin et al., 2012) se desarrollaron los objetivos inicialmente planteados en esta tesis.

I. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE StarD7 SOBRE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE CONEXINA 43 EN LAS CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS HTR-8/SVneo.

Los datos experimentales del presente trabajo demostraron que el silenciamiento de StarD7 produce una disminución en los niveles del transcripto de Cx43 en las células

trofoblásticas HTR-8/SVe0, similar a lo observado en las células JEG-3. Asociado a la disminución en los niveles del transcripto también se encontró una disminución en la expresión proteica de las distintas isoformas fosforiladas de Cx43.

Se ha reportado que las enfermedades vinculadas a la desregulación de las conexinas se pueden clasificar en aquellas directamente asociadas con mutaciones genéticas y aquellas vinculadas a la expresión o cambios en el patrón de localización. De estas enfermedades, las mutaciones germinales en los genes que codifican Cx26, Cx30, Cx31, Cx32 y Cx43 se asocian con hasta el 40-50% de todos los casos de sordera neurosensorial hereditaria (Martinez et al., 2009). También se asocian con mutaciones en los genes que codifican a estas Cxs las enfermedades de la piel como la queratitis-ictiosis y queratoderma palmoplantar que también pueden ir acompañadas de sordera, la eritroqueratodermia variabilis, la displasia ectodérmica hidrótica y el síndrome de Clouston (Laird, 2008; Richard, 2005). Los pacientes que poseen mutaciones en el gen de Cx43 presentan un desorden pleiotrópico conocido como displasia oculo-dento-digital (ODDD) que ocasionalmente se acompaña de queratoderma palmoplantar (Paznekas et al., 2009). Se ha reportado que las mutaciones descritas en el gen que codifica Cx43 se limitan a los dos primeros tercios de la región codificante lo que sugiere que la región restante del gen es resistente a las mutaciones o que estas mutaciones son letales. Los cambios sin sentido en la proteína pueden tener efectos profundos en el plegamiento general y en la estructura de la conexina, y probablemente resultan en alteraciones en las interacciones con otras proteínas.

La segunda categoría general de patologías están dadas por cambios en los niveles de expresión, el estado del ensamblaje de las subunidades para formar el conexon o la localización. El ejemplo más notable en este grupo es el cáncer. La evidencia que apoya esta idea proviene de la observación de que muchos tumores de células epiteliales humanos pierden la capacidad de comunicarse a través de las uniones Gaps y, cuando se examinan en secciones histológicas, con frecuencia carecen de placas de unión Gap en el tumor primario (Cronier et al., 2009; Laird et al., 1999; McLachlan et al., 2007). Otro ejemplo en esta segunda clase de patologías humanas relacionadas con la expresión de conexina, el ensamblaje y/o la localización, se ilustra con la relocalización

de Cx43 y la remodelación de las uniones Gaps que contribuyen a arritmias y la insuficiencia cardíaca (Beardslee et al., 2000; Severs et al., 2008). Considerando las múltiples patologías asociadas a la desregulación en la expresión de Cx43 resultó de interés profundizar el estudio de la contribución de la deficiencia de StarD7 en la expresión y función de Cx43.

Como se mencionó en la introducción, Yang y col. reportaron que ratones StarD7 +/- desarrollan una respuesta alérgica asociada a un aumento en la permeabilidad epitelial pulmonar y dermatitis atópica espontánea; mientras que la delección global del gen en ratones StarD7 -/- produce una letalidad embriónica entre el día 10-11 de gestación, probablemente relacionada a una disrupción en el desarrollo cardiovascular (Yang et al., 2015). En base a esta información y a los resultados del presente trabajo que indican que el silenciamiento de StarD7 conduce a una disminución de Cx43 es posible hipotetizar que los trastornos en la piel observados por Yang y col. en ratones haploinsuficientes pueda ser consecuencia de la disminución de Cx43. De igual manera ratones KO para Cx43 mueren tempranamente después del nacimiento por defectos asociados con obstrucción pulmonar y anomalías cardíacas (Clauss et al., 2006; Reaume et al., 1995; Rhee et al., 2009). Por lo tanto, los defectos en el desarrollo cardiovascular detectados en los ratones KO para StarD7 apoyan la idea de que la causa sería, al menos en parte, la expresión reducida de Cx43.

En resumen, los datos discutidos hasta aquí sugieren que la disminución en la expresión de Cx43 inducida por la disminución de la proteína transportadora de PC StarD7 tendría un impacto significativo en la expresión y/o función de Cx43 contribuyendo a una desregulación en la homeostasis celular.

II. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE StarD7 SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR (ECM) Y ASOCIADAS A ÉSTAS

La elevada conservación de Cx43 en diferentes taxones y la presencia del extremo C-terminal en varios sistemas de vertebrados reflejan la importancia de esta proteína más allá de su función, previamente conocida, de formación de canales. Algunas evidencias demuestran que tanto la eliminación genética como la reducción

transitoria de Cx43 afectan profundamente el transcriptoma celular, alterando la expresión de genes involucrados en diversos procesos biológicos, incluyendo la adhesión y migración celular, la dinámica del citoesqueleto, y la señalización, proliferación y diferenciación celular (Olk et al., 2010).

Los resultados obtenidos en esta parte de la tesis indican que la disminución de la expresión del ARNm de Cx43 inducida por el silenciamiento de StarD7 se asoció a una mayor expresión de los transcritos de IGTA5, IGTA1, IGTA1 y NID1. Esto se acompañó con un aumento en los niveles de las proteínas integrina $\alpha 5$, integrina $\beta 1$ madura, β -catenina y nidogen-1. Además, se detectó un aumento en la actividad de la MMP9 en el sobrenadante de las células transfectadas con siD7. En concordancia con estos resultados, Esseltine y col. informaron que la disminución en la expresión endógena de Cx43 en los fibroblastos dérmicos de los pacientes con ODDD se relacionó a niveles inusualmente altos de ARNm que codifican a las proteínas asociadas a la ECM, entre las que se encuentra integrina $\alpha 5\beta 1$, colágeno-I, laminina, MMP-1 y MMP-2 (Esseltine et al., 2015). Resultados similares se observaron durante la reparación de heridas de piel, donde la disminución de la expresión de Cx43 en las primeras etapas de la reparación de la herida se asoció a un aumento en la producción de componentes de ECM, como colágenos y MMPs (Zhang and Cui, 2017). Estos autores reportan que en las lesiones de piel hay mayor migración de fibroblastos y queratinocitos, asociado a disminución en la expresión de Cx43, lo cual es contradictorio a lo reportado en distintos modelos celulares como lo muestran Matsuuchi y Naus en su trabajo (Matsuuchi and Naus, 2013). Al respecto, es importante señalar que la cicatrización de una herida es un proceso complejo, en el cual participan la hemostasia del organismo así como la inflamación tisular asociado directamente a los niveles de Cx43, citocinas, y quimiocinas proinflamatorias (Mori et al., 2006).

Por otro lado, se sabe que la inhibición de las uniones Gaps por carbenoxolona mejoró el fenotipo de condrocitos osteoartóricos evaluado por un aumento significativo en los niveles proteicos de Col2A1 (Varela-Eirin et al., 2018).

En relación a nidogen-1 se demostró, en células JEG-3, que el silenciamiento de StarD7 conduce a un aumento en los niveles del transcrito NID1 (Tabla III). Se reportó

que promueve la adhesión de las células HTR-8/SVneo a la integrina $\beta 1/\beta 3$ (Yang et al., 1996), así como a otros componentes de la ECM, como laminina y colágeno, manteniendo la estructura de la membrana basal (Jayadev and Sherwood, 2017). Contrariamente, en las condiciones experimentales de este trabajo de tesis, el aumento de nidogen-1 inducido por el silenciamiento de StarD7 se asoció a una disminución en la adhesión celular a monocapas recubiertas de fibronectina.

Por otro lado, se reportó que la proteína nidogen-1 está implicada en la promoción de la metástasis pulmonar del cáncer de mama, del cáncer de ovario y melanoma (Aleckovic et al., 2017). Contrariamente, Ferraro y col. han identificado a nidogen-1, derivado de células endoteliales, como un inhibidor de la migración de la línea celular SK-BR-3 de cáncer de mama revelando un nuevo mecanismo para el control de la progresión del cáncer (Ferraro et al., 2019). Este hallazgo, está en concordancia con los resultados de este trabajo que indican que un aumento de nidogen-1, inducido por la depleción de StarD7, se correlaciona con una reducción de Cx43 y una disminución en la migración celular polarizada.

La proteína β -catenina está asociada a los complejos de adhesión celular y funciona como un componente clave de la vía de señalización Wnt actuando como un co-activador transcripcional. Se demostró que Cx43 es capaz de interactuar directamente con β -catenina a través de los residuos Y265 e Y313 (Spagnol et al., 2018). Los resultados obtenidos en esta tesis indican que la disminución de Cx43 inducida por el silenciamiento de StarD7 se asocia a un aumento en los niveles proteicos de β -catenina. En concordancia con estos datos, se reportó en células de origen neural, que la disminución en la expresión de Cx43 conduce a un aumento en los niveles proteicos de β -catenina y una acumulación de esta proteína en el núcleo celular de manera independiente de la función canal (Hou et al., 2019; Rinaldi et al., 2014).

En relación al mecanismo de acción de Cx43, los trabajos pioneros de Iacobas y col., realizados en astrocitos de ratones KO para Cx43, demuestran claramente que Cx43 regula la expresión de transcritos que codifican a moléculas tales como factores de transcripción, de canales y transportadores, de crecimiento celular, señales de

muerte, enzimas y moléculas de adhesión (Iacobas et al., 2003). Estos autores además reportaron que ratones KO para Cx43 presentan alteraciones en la expresión de un gran número de genes que participan en una multiplicidad de vías celulares, lo que sugiere que los genes de uniones Gap pueden ser centros de regulación de redes de expresión genética (Iacobas et al., 2012). Consistente con una función directa de Cx43 en el control de la expresión de genes y/o en la estructura de la cromatina, análisis bioinformáticos predijeron múltiples motivos de unión de ADN y ARN en la secuencia de Cx43 (Varela-Eirin et al., 2017). En este sentido, se ha demostrado la presencia de Cx43 en el núcleo de gliomas humanos, tumores colorrectales y tumores pulmonares (Aasen et al., 2019b; Crespin et al., 2016; Sirnes et al., 2012), así como en condrocitos de individuos sanos (Gago-Fuentes et al., 2015). Se ha sugerido que Cx43 puede regular la expresión de genes a través del reclutamiento de factores de transcripción al extremo C-terminal. Ensayos de co-immunoprecipitación proteómica realizados a partir de condrocitos de individuos sanos permitió identificar un número de proteínas que interactúan con Cx43, como el complejo α/β importina que importa proteínas al núcleo a través del ciclo GTP-Ran (Gago-Fuentes et al., 2015). Recientemente, se demostró, en células de anfibios y mamíferos, que la isoforma de 20 kDa de Cx43 es un regulador transcripcional de N-cadherina, interactuando con el factor de transcripción BTF3 y la polimerasa II (Kotini et al., 2018). Estos antecedentes permiten postular que la disminución de Cx43 causada por el silenciamiento de StarD7 contribuye a desregular la expresión de los genes descritos en esta tesis.

Finalmente, es importante destacar que las Cxs desempeñan un papel esencial en el desarrollo y/o la función del sistema reproductivo femenino de los mamíferos (Dunk et al., 2012). En línea con esto, se reportó que el riesgo de pérdida de embarazo está relacionado con una disminución de la expresión de Cx43 en las vellosidades coriónicas (Nair et al., 2011). Por lo tanto, los resultados de este trabajo de tesis resaltan la importancia de explorar el rol de StarD7 en patologías placentales.

III. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE StarD7 SOBRE LA ADHESIÓN Y MIGRACIÓN CELULAR POLARIZADA

La adhesión celular es un proceso esencial en la comunicación y regulación celular, y es de importancia fundamental en el desarrollo y mantenimiento de los tejidos. La interacción entre una célula y su matriz extracelular pueden influir y controlar el comportamiento y la función de las células. En esta tesis se reportó que las células HTR-8/SVneo transfectadas con siD7 tienen una menor afinidad de adhesión sobre una superficie de fibronectina. Considerando que el silenciamiento de StarD7 produce un aumento en la expresión de la integrina $\alpha 5$ e integrina $\beta 1$ madura y que el heterodímero $\alpha 5\beta 1$ reconoce eficientemente el motivo común de unión al tripéptido Arg-Gly-Asp (RGD) que se encuentra presente en la fibronectina (Danen and Sonnenberg, 2003), el resultado obtenido parece un tanto controversial. Sin embargo, está demostrado que la interacción entre la fibronectina y las integrinas es un proceso complejo que está regulado no solo por la presencia de las integrinas en la membrana celular sino también por la conformación que presentan en la membrana plasmática. La integrina $\alpha 5\beta 1$ puede existir en múltiples estados conformacionales (inactivado, intermedio activado y completamente activado) que tienen diferentes afinidades por fibronectina (Garcia et al., 1998). Esta integrina es activada por señales citoplasmáticas que actúan sobre los extremos citoplasmáticos del heterodímero formado por las dos subunidades y, posteriormente, expone una conformación "abierta" de alta afinidad para la unión del ligando (Takagi et al., 2001). Un resultado similar al reportado en esta tesis se encontró al silenciar la proteasa transmembrana ADAM9 en una línea celular de cáncer de próstata, donde se describe un aumento en los niveles de integrina $\beta 1$ en la superficie de las células, con menor adhesión sobre fibronectina relacionado a un estado inactivado de la integrina $\beta 1$ (Mygind et al., 2018), lo cual sugiere que un efecto semejante podría ocurrir en los ensayos realizados en las células HTR-8/SVneo silenciadas para StarD7.

Por otro lado, en esta tesis se demostró que el silenciamiento de StarD7 produce una disminución en la migración de las células trofoblásticas extravelosas HTR-8/SVneo. Es posible asociar la disminución en la expresión de Cx43 con la disminución en la migración que presentan las células HTR-8/SVneo cuando son transfectadas con

siD7. Numerosos estudios han demostrado un papel relevante de Cx43 en la modulación de la motilidad celular en diversos tejidos y líneas celulares (Li et al., 2008; Liu et al., 2007; Mendoza-Naranjo et al., 2012). Así, y coincidentemente con la disminución en la migración observada en las células HTR-8/SVneo, en ratones KO para Cx43 esta deficiencia causa una disminución significativa en la migración de las células de la cresta neural y de células epicárdicas (Huang et al., 1998; Li et al., 2002). Sin embargo, también se ha demostrado que Cx43 puede estimular o inhibir el comportamiento migratorio celular dependiendo de diferentes contextos biológicos (Matsuuchi and Naus, 2013).

Por otro lado, al igual que la disminución en la adhesión sobre fibronectina, también resulta contradictorio que el aumento en la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ no produzca mayor migración en las células HTR-8/SVneo transfectadas con siD7. Concordante con estos resultados, se reportó que el tratamiento de las células HTR-8/SVneo con la droga teratogénica valproato también conduce a un aumento en la expresión de la integrina $\beta 1$ y menor migración, lo que sugiere que el solo aumento en los niveles de expresión de la subunidad $\beta 1$ de integrina no resulta determinante en el control de la migración celular (Rout, 2006).

Se sabe que las células trofoblásticas extravelosas, durante su diferenciación, upregulan sobre su superficie celular los heterodímeros $\alpha V\beta 3$ y $\alpha 1\beta 1$, que promueven la migración celular y $\alpha 5\beta 1$ que modula el anclaje a superficies de fibronectina (Knofler, 2010; Harris et al, 2009). Además, se demostró que se requiere la N-glicosilación del dominio extracelular de la integrina $\alpha 5$ la que controla la dinámica del reciclado del heterodímero $\alpha 5\beta 1$ y las adhesiones focales necesarias para la adhesión y la migración celular (Hang et al., 2017). Por lo tanto, estudios futuros son necesarios para determinar si la deficiencia de StarD7 modifica la glicosilación de la integrina $\alpha 5$ y/o el reciclado del heterodímero $\alpha 5\beta 1$.

En esta sección, también se reportó que las células HTR-8/SVneo transfectadas con siD7 presentan menores niveles proteicos de Twist1 que las células control. Como se mencionó, Twist1 es un factor de transcripción, altamente conservado, involucrado en la regulación de la expresión de genes que promueven la migración y la invasión

celular (Lee and Yutzey, 2011). Se describieron niveles elevados de Twist1 en células de cáncer de mama, glioma, próstata, melanoma y neuroblastoma que tienen un alto poder metastásico (Ansieau et al., 2010). En coincidencia con lo observado en las células HTR-8/SVneo transfectadas con siD7, se ha demostrado que el silenciamiento de Twist1 produce una disminución en la migración en células de hepatoma y en la línea celular de melanoma A2058 (Ding et al., 2019; Matsuo et al., 2009). Al respecto, se observó que el silenciamiento de StarD7 en las células JEG-3 origina una disminución en la expresión del ARNm de Twist1 (Tabla II). Esta disminución del transcripto de Twist1 podría también explicar la disminución en la proliferación de las células JEG-3 transfectadas con siD7 (Flores-Martin et al., 2012), ya que también está demostrada la participación de Twist1 en la regulación de la proliferación celular (Qian et al., 2013).

Al igual que la adhesión celular, la migración celular tiene un rol central en el desarrollo y la remodelación de los tejidos. La migración celular es un proceso integrado que involucra la coordinación de señales bioquímicas y biomecánicas complejas que modulan la morfología celular, reorganizando dinámicamente los filamentos del citoesqueleto causando tracción celular (Schwartz and Horwitz, 2006). En el embarazo, la migración de las células trofoblásticas es de gran importancia para la implantación y el desarrollo temprano del embrión (Cohen and Bischof, 2007). Mediante un proceso regulado por múltiples factores, los citotrofoblastos extravelosos derivados de las células trofoblásticas columnares invaden la pared uterina materna para el establecimiento exitoso del embarazo humano (Knofler, 2010). Recientemente se ha reportado, en ensayos de cocultivos de fibroblastos endometriales humanos y células HTR-8/SVneo, que el silenciamiento por separado de cada uno de los 16 genes detectados a partir de un análisis transcriptómico, entre los cuales se encuentra StarD7, produce una disminución en la migración e invasión de las células trofoblásticas hacia los fibroblastos (Kshitiz et al., 2019). Estos hallazgos, en línea con los resultados de esta tesis, sugieren que StarD7 contribuiría a una migración e invasión controlada de los trofoblastos en el endometrio materno.

Más allá de los cambios inducidos por la depleción de StarD7 en la expresión de Cx43, Twist1 y las integrinas, observados en este trabajo de tesis, es importante

considerar los efectos del silenciamiento de StarD7 sobre la composición de los lípidos de las membranas mitocondriales, la funcionalidad de las mitocondrias y la activación de UPR (Flores-Martin et al., 2016; Horibata et al., 2016; Horibata et al., 2020; Yang et al., 2017). En conjunto estos resultados dan cuenta de la complejidad de los procesos celulares inducidos por el silenciamiento de StarD7 a los fines de describir el mecanismo molecular involucrado en la adhesión sobre fibronectina y la migración celular.

IV. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE StarD7 SOBRE LA MORFOLOGÍA DEL APARATO DE GOLGI Y LA LOCALIZACIÓN DEL CENTRO ORGANIZADOR DE MICROTÚBULOS (MTOC)

Como se mencionó, la migración celular polarizada es un proceso complejo que depende de la interacción cooperativa de numerosos componentes celulares, entre los cuales se encuentra el aparato de Golgi. Esta organela media el transporte y la modificación de proteínas y lípidos, aunque en los últimos años se ha identificado la participación del Golgi en la regulación de una amplia gama de procesos celulares, como la reparación del ADN, la mitosis, el metabolismo y la autofagia (Abdel Rahman et al., 2015; Farber-Katz et al., 2014; Rabouille and Kondylis, 2007; Yamamoto et al., 2012). Su rol fundamental en la polaridad celular, la migración celular direccional y la bipolaridad del huso mitótico han sido ampliamente estudiados (Bershadsky and Futerman, 1994; Guizzunti and Seemann, 2016). La polarización celular es uno de los fenómenos más importantes en la migración celular direccional (Zhu et al., 2018). En la polarización celular, el aparato de Golgi está críticamente involucrado en la migración celular direccional, ya que actúa como parte fundamental en el suministro de los componentes de membrana al frente de migración para la formación de la protrusión de la membrana cuando la célula se mueve (Prigozhina and Waterman-Storer, 2004; Raftopoulou and Hall, 2004). La distribución asimétrica de la actividad protrusional es una característica general de la motilidad direccional (Bershadsky and Futerman, 1994), que requiere la integridad del Golgi y de los microtúbulos.

Considerando la importancia de la integridad de esta organela para la migración celular, se evaluó la misma en las células HTR-8/SVneo transfectadas con el siD7 demostrando que un gran porcentaje de las células presentan el aparato de Golgi fragmentado evidenciado mediante inmunofluorescencia de las proteínas integrales del Golgi GM130 y golgina 97. Estos resultados proveen un antecedente más donde se relaciona la fragmentación del aparato de Golgi y la migración celular disminuida. Coincidente con los resultados de esta tesis, un trabajo reciente reporta que el silenciamiento de la proteína DRG2 en células HeLa produce una disminución en la migración celular asociado a fragmentación del aparato de Golgi determinado mediante inmunofluorescencia de GM130 (Mani et al., 2019). Por otro lado, se sabe que la fragmentación del aparato de Golgi también se asocia a estrés de RE (Nakagomi et al., 2008) y a alteración de la estructura mitocondrial (Baloyannis, 2011). Al respecto, resultados de nuestro laboratorio indican que el silenciamiento de StarD7 en las células HepG2 genera estrés de RE y alteración en la morfología mitocondrial (Flores-Martin et al., 2016), antecedentes que avalan los datos obtenidos en células HTR-8/SVneo transfectadas con siD7.

El citoesqueleto de actina es otro componente esencial en la migración de las células eucariotas, determinando la polaridad de la fuerza de empuje producida por la polimerización de la actina que se origina por la polaridad estructural de los filamentos de actina (Svitkina, 2018). Hay una relación funcional entre los elementos del citoesqueleto (microtúbulos, filamentos de actina o microfilamentos y filamentos intermedios) y la dinámica del Golgi. La función del aparato de Golgi es el resultado de una interacción compleja entre moléculas que establecen su arquitectura, entre los que se encuentran los elementos del citoesqueleto (Egea et al., 2013). Algunos reportes demuestran que la integridad del aparato de Golgi se ve alterada ante la polimerización descontrolada de actina (Zilberman et al., 2011) o por la despolimerización de los filamentos actina (Valderrama et al., 2001). En esta sección de la tesis se muestra que las células transfectadas con siD7 no poseen alterada la red del citoesqueleto formada por las fibras de actina, sugiriendo que ésta no es la causa de la fragmentación del aparato de Golgi.

Se conoce que la estructura del aparato de Golgi es mantenida por la interacción directa de esta organela con los microtúbulos a través de Golgina-160 y dineína (Yadav et al., 2012). Además, se reportó que existen microtúbulos que derivan del aparato de Golgi indispensables para mantener una migración celular persistente (Hao et al., 2020). También se sabe que la localización perinuclear del Golgi se debe a la interacción con el MTOC a través de las proteínas GMAP210 y γ -tubulina (Cardenas et al., 2009). Esta última proteína forma un complejo de anillos ubicados en el MTOC, que nuclea los microtúbulos y se localiza en el frente de la célula durante la migración polarizada (Gotlieb et al., 1983). En base a este conocimiento resulta relevante para los resultados de esta tesis considerar la asociación que existe entre el aparato de Golgi, el MTOC y la migración polarizada sumada a los numerosos antecedentes que demuestran la relación entre la disminución de la expresión de Cx43 y la alteración en la migración polarizada producto de una localización errática del MTOC.

V. EFECTO DE LA RECUPERACIÓN DE LOS NIVELES DE StarD7 O CONEXINA 43 EN LAS CÉLULAS SILENCIADAS

Múltiples factores tales como la estructura genómica, factores transcripcionales y factores epigenéticos modulan la transcripción de las Cxs (Oyamada et al., 2013). Sin embargo, la forma en que se produce la interacción entre estos mecanismos reguladores sigue siendo investigada.

En esta sección se demostró que los cambios en los niveles proteicos de Cx43 y nidogen-1 inducidos por el silenciamiento de StarD7 se restablecen al recuperar los niveles de StarD7, sugiriendo que la alteración en la abundancia de Cx43 y nidogen-1 detectada es dependiente de la cantidad de StarD7 presente en la célula. Por otro lado, resultados preliminares demuestran que al recuperar los niveles de Cx43 en las células silenciadas contra StarD7 se restablecen los niveles de nidogen-1, manteniendo disminuidos la proteína StarD7; lo que indica que la expresión de nidogen-1 depende directamente de los niveles de Cx43 e indirectamente de la expresión de StarD7.

Aunque no existen publicaciones que reporten la participación de StarD7 en la regulación de expresión de genes, es posible hipotetizar que StarD7 podría regular la expresión de Cx43 de manera indirecta. Esta hipótesis se sustenta en los resultados reportados por Flores y col. que indican que StarD7 interacciona con las proteínas GW182 (TNRC6A, B Y C) del complejo argonauta sugiriendo que, más allá de su rol como proteína transportadora de lípidos a la mitocondria, StarD7 podría ser un componente de la maquinaria de silenciamiento celular (Flores-Martin, 2015). Las proteínas GW182 interactúan directamente con las proteínas argonautas, las cuales son necesarias para el silenciamiento génico mediado por miRNA en células animales (Niaz and Hussain, 2018). Se sabe que un miRNA puede regular distintos ARNm controlando diferentes procesos biológicos como la proliferación, diferenciación y muerte celular y envejecimiento (Hammond, 2015) y que dentro de los factores epigenéticos que regulan la expresión de Cx43 se encuentran los miRNAs. Es posible citar ejemplos, como miR-1 el cual reduce los niveles de Cx43 en miocitos ventriculares de ratas neonatas (Yang et al., 2007) o miR-206 y miR-1 que inhiben la expresión de Cx43 durante la diferenciación de mioblastos in vitro e in vivo (Anderson et al., 2006). Es interesante señalar que miR-206 también regula de manera negativa la expresión de StarD7 controlando la proliferación de los adipocitos porcinos (Xu et al., 2020).

Por otro lado, en esta sección se demostró de manera preliminar que las células transfectadas con siD7 que recuperan los niveles de Cx43 (por sobreexpresión de Cx43) presentan mayor capacidad migratoria que las células que tienen disminuido los niveles de Cx43 por el silenciamiento de StarD7. Este resultado sugiere que la disminución de la migración polarizada en las células HTR-8/SVneo transfectadas con siD7 sería dependiente de la disminución de los niveles de Cx43. Al respecto, se reportó que el silenciamiento de Cx43 en las células MCF-10 de cáncer de mama conduce a una mínima adhesión celular, y una migración muy rápida y al azar, con una pobre polaridad celular (Simpson et al., 2008). Coincidente con este resultado las células de la cresta neural que tienen delecionada la expresión de Cx43 carecen de protrusiones unidireccionales que faciliten el movimiento hacia adelante de las células (Huang et al., 1998). Los resultados de esta tesis concuerdan con estos antecedentes donde se demuestra que las células transfectadas con siD7, que tienen disminuida la

expresión de Cx43, tienen alterada la localización del MTOC y fragmentado el aparato de Golgi, lo cual lleva a que las células tengan una menor migración polarizada. Si bien no se ha descrito aún un mecanismo preciso que explique la participación de Cx43 en la migración celular, está ampliamente aceptado que la modulación de los niveles de Cx43 alteran la migración celular. Como se mencionó anteriormente, Cx43 tiene en el extremo carboxilo terminal múltiples sitios de interacción para proteínas que participan y modulan diferentes vías de señalización con un potencial impacto en eventos asociados a cambios en la morfología, polarización y migración celular. Existen numerosos estudios que muestran interacciones de Cx43 con proteínas asociadas con el citoesqueleto como interacciones con N-cadherina, p120, β -catenina, vinculina, p150, ZO-1 y diversas proteínas asociadas a actina (Leithe et al., 2018). Se reportó pérdida de migración polarizada en células MEF de ratón con Cx43 delecionada que se recuperó al transfectar las células con un plásmido que expresa la versión completa de Cx43 pero no con una mutante que carece del extremo C-terminal. Curiosamente, al transfectar las células KO para Cx43 con una forma de Cx43 que tiene una deleción que le impide formar canales, estas células también recuperan su capacidad migratoria, lo cual demuestra que Cx43 regula la migración celular a través de una función no canónica independiente de su función de canal (Francis et al., 2011). Algunos autores proponen que existen dos poblaciones de Cx43, una población involucrada en la formación de canales y otra población cuyos dominios C-terminal sirven como andamios de anclaje dinámicos para las diversas proteínas asociadas que regulan el citoesqueleto. Esta teoría está sustentada por la distribución que presenta Cx43 en células cardíacas, donde una fracción se localiza en una región de la membrana plasmática formando conexiones y otra fracción se encuentran interaccionando con ZO-1 (Rhett and Gourdie, 2012). Futuros trabajos de complementación de las células silenciadas contra StarD7 y transfectadas con un plásmido que exprese solamente la región carboxilo-terminal de Cx43 permitirán dilucidar la importancia de esta región en la regulación de la migración polarizada en las células HTR-8/SVneo.

ANEXO I

Cuantificación de StarD7 en condrocitos de pacientes con osteoartritis

En esta parte de la tesis se presentan los resultados obtenidos durante la pasantía realizada en el laboratorio de la Dra. María Mayán Santos en el Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña, La Coruña, España. El objetivo fue analizar los niveles de expresión de la proteína StarD7 en un contexto patológico asociado a la alteración en la expresión de Cx43. Se utilizó como modelo de estudio condrocitos de pacientes con osteoartritis (OA) ya que está ampliamente documentado un aumento en la expresión de Cx43 en el cartílago de estos pacientes (Mayan et al., 2013).

El tejido articular está constituido por unas únicas células funcionales llamadas condrocitos y por una compleja matriz extracelular (ECM) formada principalmente por colágeno tipo II y proteoglicanos que cubren los extremos de los huesos. Los condrocitos son células altamente especializadas alojadas en la ECM siendo responsables de regular y modificar el tejido articular a lo largo de la vida adulta (Sandell and Aigner, 2001).

La OA es una enfermedad caracterizada por la degeneración progresiva del cartílago articular generando dolor, hinchazón y rigidez en las articulaciones. Los pacientes con OA muestran una acumulación de células desdiferenciadas y senescentes junto con un aumento de la inflamación y la descomposición de la matriz extracelular del cartílago. En la OA se pierde el equilibrio entre la formación y degradación del cartílago producida por los condroblastos. Esto conduce a cambios patológicos que se caracterizan comúnmente por la pérdida progresiva de cartílago, la inflamación sinovial, la remodelación del hueso subcondrial y la formación de osteofitos (crecimiento excesivo del hueso). Las erosiones en el cartílago exponen al hueso subyacente a una mayor tensión en la articulación, lo que conduce a microfracturas y quistes. Junto con las enfermedades cardíacas y el cáncer, la OA es una de las principales causas de discapacidad a corto plazo en el mundo occidental y su incidencia aumenta fuertemente con la edad (Varela-Eirin et al., 2020).

Los mecanismos responsables de desencadenar la OA son poco conocidos aún, aunque están reportadas las alteraciones que se producen en los componentes del tejido articular. Se ha descrito en condrocitos de pacientes con OA sobreexpresión de Cx43 que conduce a una acumulación de células desdiferenciadas y senescentes

implicadas en la progresión de la enfermedad. La sobreexpresión de Cx43 en los condrocitos osteoartóricos compromete su capacidad de rediferenciación debido a que niveles controlados de Cx43 son necesarios para regular la diferenciación celular (Varela-Eirín et al., 2020). Estos cambios fenotípicos resultan en la síntesis de factores remodeladores de la ECM involucrados en la degradación del tejido (MMPs) y factores pro-inflamatorios tales como IL-1 β e IL-6, los cuales facilitan la dediferenciación y reprogramación de las células vecinas (Figura 28). Además, se reportó disfunción mitocondrial en condrocitos de pacientes con OA y disminución de la actividad de los complejos I, II y III de la cadena de transporte electrónico (Blanco et al., 2011; Maneiro et al., 2003). Recientemente se observó, mediante microscopía electrónica, daños en la estructura mitocondrial en los condrocitos de pacientes con OA respecto a las mitocondrias de los condrocitos de individuos control (Liu et al., 2019).

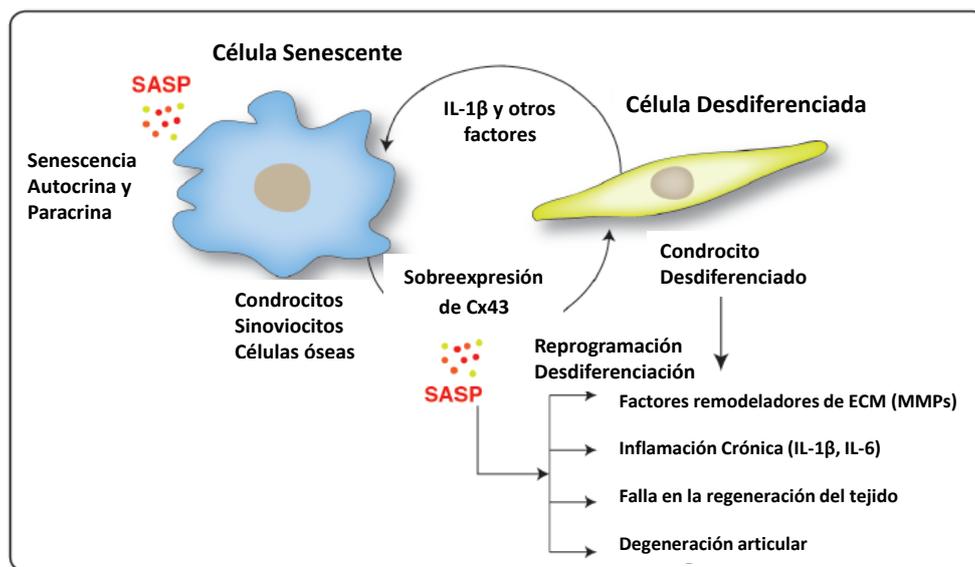


Figura 28. Efecto de la sobreexpresión de Cx43 en condrocitos de pacientes con osteoartritis. SASP: Fenotipo secretorio asociado a senescencia. Adaptada de Varela-Eirín y col 2020, (Varela-Eirín et al., 2020).

La expresión de StarD7 está disminuida en los condrocitos de pacientes con osteoartritis

Con el fin de determinar los niveles de expresión de StarD7 en condrocitos de pacientes con OA se realizaron ensayos de Western blot a partir de muestras biológicas humanas procedentes de pacientes del Complejo Hospitalario Universitario

de A Coruña (España). Las muestras se obtuvieron de cartílago articular de rodilla y de la cabeza femoral de donantes adultos después de una cirugía articular con el consentimiento informado y la aprobación del Comité de Ética Institucional. Los condrocitos fueron aislados y cultivados como se detalla en material y métodos. La Figura 29A muestra un ensayo de Western blot representativo realizado a partir de extractos proteicos de condrocitos que indica que los niveles de Cx43 están aumentados en los condrocitos de pacientes con OA respecto a los condrocitos de individuos sanos, confirmando el diagnóstico de OA. Por el contrario, y a diferencia de lo esperado, se observó una disminución en los niveles de expresión de StarD7 en los extractos proteicos de condrocitos de pacientes con OA respecto a los de los individuos control (Figura 29B y 29C). Si bien, el número de muestras analizadas es pequeño, estos resultados sugieren que en el contexto del cartílago articular con degeneración osteoartítica no se observa una relación directa entre la expresión de StarD7 y Cx43, como la detectada en células trofoblásticas.

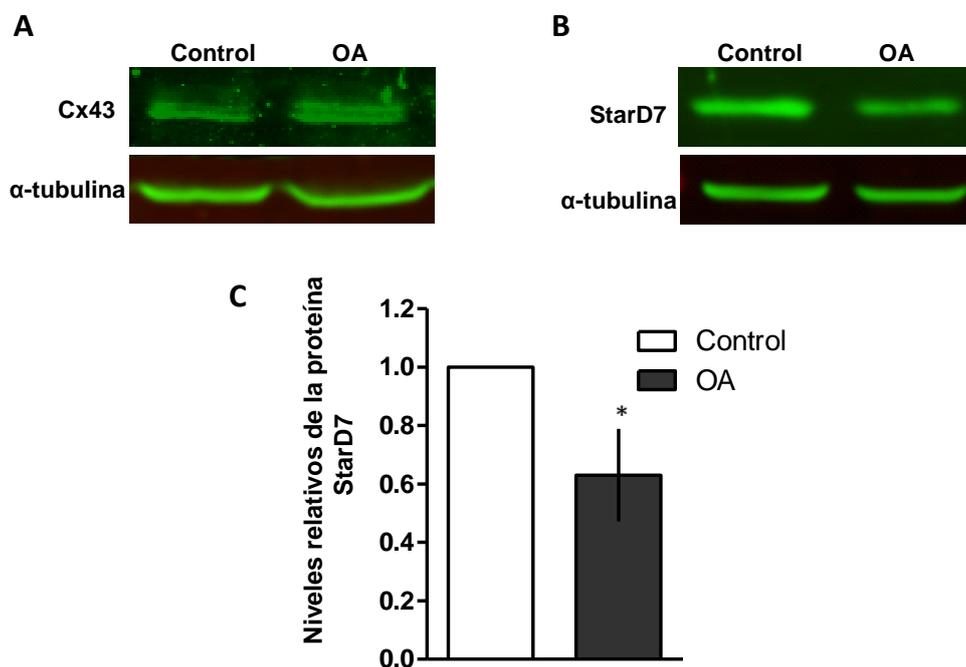


Figura 29. Expresión de Cx43 y StarD7 en condrocitos de individuos sanos y pacientes con osteoartritis. A) Ensayos de Western blot representativos realizados a partir de extractos proteicos de condrocitos de individuos sanos (Control, n=3) y de pacientes con osteoartritis (OA, n=6). Se utilizaron anticuerpos contra Cx43 y StarD7, respectivamente. Se utilizó α -tubulina como control de carga. **B)** Cuantificación densitométrica de las bandas correspondientes a StarD7 normalizadas con la señal de α -tubulina y relativizadas a la condición control considerada 1. (* $p < 0,05$ one sample t-test). La barra indica la media \pm error estándar de la media (SEM).

Los condrocitos de pacientes con osteoartritis poseen alterada la estructura mitocondrial y aumentados los niveles de Mfn2

Se conoce que la deficiencia de StarD7 compromete la funcionalidad mitocondrial y en algunos contextos afecta adversamente la composición de PC, la actividad respiratoria y la estructura de las crestas mitocondriales (Flores-Martin et al., 2016; Horibata et al., 2016), por lo cual resultó de interés evaluar la estructura de las mitocondrias de los condrocitos de pacientes con OA. Para ello, se marcó con Mitotracker Deep Red la membrana de las mitocondrias y se analizó la morfología mitocondrial mediante microscopía de fluorescencia. El análisis de las imágenes obtenidas de los condrocitos de dos individuos control y dos pacientes con OA (15 condrocitos por paciente) permitió confirmar que los condrocitos de pacientes con OA presentan células con las mitocondrias alteradas (Figura 30A), coincidente con lo reportado por otros autores (Blanco et al., 2011; Maneiro et al., 2003). A los fines de evaluar si estos cambios en la morfología mitocondrial se correlacionan con alteraciones en las proteínas que participan en los mecanismos de fusión y fisión mitocondrial, se analizó mediante Western blot los niveles de las proteínas, Mfn2 y Drp1, proteínas involucradas en los eventos de fusión y fisión, respectivamente. La Figura 30B muestra una disminución en los niveles de Mfn2 en los condrocitos de pacientes con OA respecto a las muestras control, sin variaciones en los niveles de Drp1. Se sabe que Mfn2, además de su actividad fusogénica, forma parte del complejo proteico involucrado en el mantenimiento de la distancia entre el RE y la mitocondria regulando, entre otras funciones, el flujo de calcio (Filadi et al., 2015). Por lo que es posible hipotetizar que la disminución de Mfn2 originaría, en los condrocitos de pacientes con OA, un aumento en los contactos RE-mitocondria potenciando la transferencia de calcio entre ambas organelas y una mayor sensibilidad a estímulos apoptóticos, como fue previamente reportado (Filadi et al., 2015).

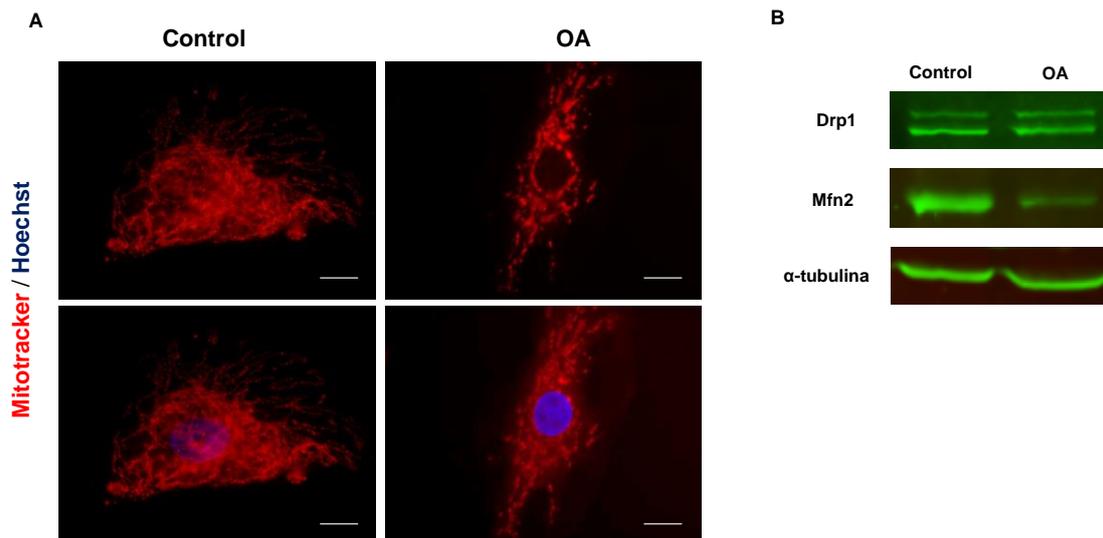


Figura 30. Los condrocitos de pacientes con osteoartritis presentan alterada la estructura mitocondrial y niveles proteicos de Mfn2 disminuidos. A) Imágenes representativas de condrocitos de individuos sanos (control) y de condrocitos de pacientes con osteoartritis (OA) marcados con MitoTracker Deep Red, los núcleos se tiñeron con Hoechst. Las imágenes fueron obtenidas con microscopio de fluorescencia y un aumento 100X. Barra= 5 μ m. **B)** Ensayos de Western blot representativo realizados con extractos totales de condrocitos de individuos control y de condrocitos de pacientes con OA. Se utilizaron anticuerpos contra las proteínas Drp1 y Mfn2. Se utilizó α -tubulina como control de carga.

En conjunto estos resultados indican que los condrocitos de pacientes con OA tienen menor expresión de StarD7, morfología mitocondrial alterada y niveles disminuidos de Mfn2 respecto a los condrocitos de individuos control.

Para confirmar la participación de StarD7 en la osteoartritis sería importante profundizar los estudios en modelos animales adecuados, así como en una mayor cohorte de pacientes con OA. Estos estudios podrían contribuir a la comprensión de la fisiopatología de esta enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

MÉTODOS DE BIOLOGÍA CELULAR

Cultivo de líneas celulares eucariotas

Para llevar a cabo los diferentes experimentos realizados en este trabajo de tesis se utilizaron las siguientes líneas celulares:

HTR-8/SVneo es una línea celular de origen extravelloso derivada de citotrofoblastos humanos con características invasivas (donada por el Dr. Charles Graham, Queen's University, Canadá). Es una línea celular establecida a partir de células extravellosas de placenta humana de primer trimestre transfectadas con el gen que codifica al antígeno T grande del virus 40 del simio. La línea celular HTR-8/SVneo se cultivó a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en DMEM/F12 alta glucosa suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 50 U/mL concentración final de penicilina y 50 µg/mL concentración final de estreptomycin.

HEK293T (Human Embryonic Kidney) es una línea celular derivada de células embrionarias de riñón humano. La línea celular HEK293T fue establecida a partir de la transfección de las células de riñón normal con el gen que codifica al antígeno T grande del virus 40 del simio. La línea celular HEK293T se cultivó a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) alta glucosa suplementado con 10% de SFB, 50 U/mL concentración final de penicilina y 50 µg/mL concentración final de estreptomycin.

Las células se cultivaron en placas de 12 pocillos (1x10⁴ células por pocillo); placas de 6 pocillos (1x10⁵ células por pocillo) o en placas de 96 pocillos (0,3x10⁴ células por pocillo) según se indica.

Cultivo primario de condrocitos humanos

Para el aislamiento de condrocitos las muestras de biopsias fueron lavadas con solución salina durante el tiempo necesario para eliminar los glóbulos rojos. Posteriormente, se realizaron cortes paralelos a la superficie articular con un bisturí, separando el cartílago articular de hueso subcondral para obtener láminas de cartílago articular y facilitar la digestión mecánica y química. La digestión química se realizó con

una solución de tripsina-EDTA (0,5 mg/ml) durante 10 minutos a 37°C con agitación, se decantó y se incubó con colagenasa tipo IV de *Clostridium*, 2 mg/ml (Gibco, Invitrogen) en DMEM suplementado al 5% con SFB durante 16 – 18 horas a 37°C con agitación, para liberar las células de la ECM. Esta solución se pasó por filtros con poros de 100 µm para eliminar los restos de cartílago no digerido. El filtrado se centrifugó a 1500 rpm 5 minutos a temperatura ambiente (TA), el sobrenadante se descartó y las células se contaron en una cámara de *Neubauer* para cultivar las células según el número obtenido. Los condrocitos se mantuvieron en cultivo en medio DMEM suplementado con 15% de SFB a 37°C y en una atmósfera de 5 % deCO₂. Cuando los condrocitos alcanzaron una confluencia del 70–80% se expandieron mediante tripsinización o se recogieron para la realización de los experimentos. El tiempo de cultivo no se prolongó más allá de la quinta semana para evitar la desdiferenciación a fibroblastos.

Silenciamiento de la expresión de StarD7

En el presente trabajo de tesis se utilizó siRNA (small interfering RNA) como una herramienta para silenciar post-transcripcionalmente la expresión del gen StarD7. Para tal fin se utilizó el oligonucleótido que tiene la siguiente secuencia: siRNA sentido, 5´GGU AUA GUG UGG AUC AGG ATT3´ correspondiente a la posición 1026-1046 (Genbank AF270647). Se utilizó como control negativo siRNA scrambled (siC) (Silencer Negative™) (Applied Biosystems/Ambion). Para realizar la transfección de las células HTR-8/SVneo con siD7 o siC se utilizó el reactivo Lipofectamina RNAimax (Invitrogen # 13778100) siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. Veinticuatro horas antes de la transfección se recogieron las células mediante tripsinización, se contaron en cámara de *Neubauer* y se plaquero 90.000 células por pocillo en una placa de 6 pocillos, con medio suplementado (DMEM/F12 alta glucosa suplementado con 10% de SFB, 50 U/mL concentración final de penicilina y 50 µg/mL concentración final de estreptomina).

Al día siguiente se controló que la confluencia de las células no exceda el 30%-40% y posteriormente se procedió a preparar la mezcla de transfección. La mezcla de transfección se preparó de la siguiente forma: en dos tubos eppendorf se agregó 125 µL de Opti-MEM (Invitrogen), en uno de los tubos se agregó 4 µL de Lipofectamina

RNAimax y en el otro 2,5 μL de siD7 (stock: 20 pmol/ μL) ó 1 μL de siC (stock: 50 μM). Ambos tubos se agitaron con vortex durante 30 seg y se centrifugaron durante 15 seg a 12.000 rpm. Posteriormente se dejaron reposar a TA durante 5 min. Cumplidos los 5 min, se procedió a juntar el contenido de los 2 tubos, se agitó con vortex durante 30 seg y se centrifugaron durante 15 seg a 10.000 rpm. Posteriormente se dejó reposar a TA durante 20 min. Al cumplirse los 20 min, se lavaron las células con PBS (solución salina balanceada) una vez y se le agregó a cada pocillo 750 μL de Opti-MEM y posteriormente los 250 μL de la mezcla preparada inicialmente. Después de 6 horas se les cambio el medio de transfección por 2 mL de medio suplementado apropiado y se cultivaron durante 72h o 90h (según se indica), renovando el medio cada 24h.

Ensayo de reparación de la herida (wound healing)

El ensayo de reparación de la herida es una técnica utilizada para estudiar la migración celular y la interacción célula-célula. Este ensayo se basa en la observación de que, al crearse una herida artificial en una monocapa de células confluentes, las células del borde de la herida comienzan a migrar hasta que se establecen nuevos contactos entre células. Para tal fin, se trabajó con monocapas confluentes de células transfectadas con siC o siD7 y cultivadas durante 72h. Transcurrido ese tiempo se realizó sobre la monocapa una herida con una punta estéril fina, la monocapa se lavó 3 veces cuidadosamente con PBS 1X para sacar las células que se desprendieron y se colocó medio suplementado. Se realizaron 5 heridas por pocillo en una placa de 6 pocillos y 1 herida en una placa de 96 pocillos. Después de lavar las células, se obtuvieron imágenes mediante microscopio invertido con contraste de fase (20X, Leica) y mediante la memoria de la platina motorizada se guardaron las coordenadas de la localización de la herida para después de 8 horas obtener la imagen exacta de la herida analizada a tiempo "0". Finalmente, las imágenes se analizaron mediante el programa FIJI para determinar el área de la herida correspondiente a ambos tiempos de observación. Los resultados se expresaron en porcentaje del área remanente de la herida con respecto al área inicial.

Ensayo de adhesión celular sobre superficie de fibronectina

La adhesión celular desempeña un papel importante en la comunicación y regulación celular. Es posible estudiar este proceso cultivando las células sobre distintas superficies sensibilizadas con componentes de la matriz extracelular, como por ejemplo fibronectina. Para llevar a cabo este ensayo, se preparó una solución de gelatina al 0,1% en PBS estéril y se disolvió dejando en un baño a 37°C durante 2 horas. Luego, se preparó una solución de 10 µg/mL de fibronectina disuelto en 0,1% gelatina PBS 1X estéril, partiendo de una solución de 1 mg/mL de fibronectina (Sigma F1141). Posteriormente, se sensibilizó la superficie de los pocillos de placas de 12 pocillos con esta solución agregando 200 µL de la solución de fibronectina por pocillo y se incubó a 37°C en estufa de cultivo durante 12h. Cumplido este tiempo, se lavó 3 veces cada pocillo con 250 µL de PBS 1X. Posteriormente se plaquearon sobre los pocillos 10.000 células HTR-8/SVneo previamente transfectadas con siC o siD7 y cultivadas durante 72h. Inmediatamente las células recién plaqueadas se llevaron al equipo IN Cell Analyzer 2500 HS (High Content Analysis, GE Healthcare Life Sciences) donde se obtuvieron imágenes cada 30 seg manteniendo las células a 37°C. Las imágenes se analizaron mediante el programa FIJI.

Generación de partículas virales que expresan StarD7.I

Se plaquearon en una placa de 100 mm 1×10^6 células HEK293T para tener una confluencia del 60-80%. A día siguiente se realizó la transfección de las células con los plásmidos pSPAX2 (*2nd generation lentiviral packaging plasmid*), pMD2.G (*VSV-G envelope expressing plasmid*) y pLentiStarD7I (plásmido construido en el laboratorio, ver Tabla VIII) siguiendo los siguientes pasos: se preparó la mezcla de transfección con 500 µl del buffer del reactivo de transfección JetPRIME (Polypus Transfection), 2,5 µg de pSPAX2, 0,5 µg de pMD2.G y 2,5 µg de pLentiStarD7I. La mezcla se agitó con vortex durante 10 seg y luego se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 seg. Posteriormente, se agregó 10 µl del reactivo JetPRIME, se agitó con vortex durante 30 seg y centrifugó a 10.000 rpm durante 30 seg. Se dejó reposar durante 15 min a TA y luego se la adicionó a la placa de cultivo que tiene las células completando a un volumen final de 10 ml con DMEM y SFB 10%. Después de 16 horas de transfección se cambió el medio

adicionando 6 ml de medio completo (DMEM+SFB 10%+ Penicilina/Estreptomicina). Después de 48 horas las partículas virales generadas lisaron la mayoría de las células. Se recogió el medio en un Falcon de 15 ml y se agregó nuevamente 6 ml de medio completo. El tubo Falcon se centrifugó a 3.000 rpm durante 5 min para separar las células muertas del sobrenadante. El sobrenadante se alicuotó en tubos eppendorf y se conservó hasta su uso a -80°C. Después de 24h se repitió este último paso descartando la placa en la que se crecieron las células. Nota: todo el procedimiento se debe realizar en una cabina de bioseguridad tipo II.

Ensayo de recuperación de los niveles de StarD7.I

Se plaquearon 60.000 células HTR-8/SVneo por pocillo en una placa de 6 pocillos. Después de 16 h, se transfectaron 3 pocillos con siD7 y 3 pocillos con siC siguiendo el siguiente protocolo:

En un tubo eppendorf se agregó 100 μ L del buffer del reactivo de transfección JetPRIME, 1,5 μ L de siRNA StarD7 (stock 20 pmol/ μ L) ó 1 μ L de siRNA control (stock 50 μ M), según corresponda. Se agitó vigorosamente durante 10 seg y luego se agregó 4 μ L de reactivo JetPRIME a cada uno de los tubos. Se agitó nuevamente vigorosamente durante 10 seg y se centrifugó a 5.000 rpm durante 2 min. Se dejó reposar durante 20 min a TA y se agregó a cada pocillo 105,5 μ l de la mezcla para la transfección con siD7 y 105,0 μ l de la mezcla de siC completando a un volumen final de 1 ml con DMEM/F12 SBF al 1% sin antibiótico. Después de 6h se cambió el medio por medio completo (DMEM/F12 con SBF al 10% más antibiótico). Trascorridas 54h de cultivo, 2 pocillos que fueron transfectados con siD7 se infectaron con las partículas virales generadas con el plásmido pLenti StarD7.I o vector vacío. Para tal fin, se agregó 1,33 μ L de Polibrene (Stock 8 μ g/ μ L, Santa Cruz Biotech) a un tubo eppendorf que contenía 1000 μ L de partículas virales que expresan pLenti StarD7.I y se mezcló por inversión, mientras que a 2000 μ L de medio completo se le agregó 2,66 μ L del mismo Polibrene y se mezcló por inversión. A uno de los pocillos seleccionados se le agregó 800 μ L de medio completo con Polibrene más 200 μ L de partículas virales generadas a partir de pLenti StarD7.I (infección al 20%); mientras que al otro pocillo se le agregó 600 μ L de medio completo con Polibrene más 400 μ L de partículas virales generadas a partir de

pLenti StarD7.I (infección al 40%). Al cumplirse las 90h de ensayo se extrajeron las proteínas con 150 μ L por pocillo de buffer Leammi 2X (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, glicerol 25%, 2% dodecildisulfato sódico (SDS) más 50 μ L de β -mercaptoetanol (Sigma)). Los extractos proteicos se reservaron para realizar los ensayos de Western blot. Transducciones similares se realizaron a partir de partículas virales generadas a partir del vector vacío.

Ensayo de recuperación de los niveles de Cx43

Se plaquearon 60.000 células HTR-8/SVneo por pocillo en una placa de 6 pocillos. Después de 16 h, se transfectaron 3 pocillos con siD7 y 3 pocillos con siC siguiendo el siguiente protocolo:

En un tubo eppendorf se agregó 100 μ L del buffer del reactivo de transfección JetPRIME, 1,5 μ L de siRNA StarD7 (stock 20 pmol/ μ L) ó 1 μ L de siRNA control (stock 50 μ M) según corresponda. Se agitó vigorosamente durante 10 seg y luego se agregó 4 μ L de reactivo JetPRIME a cada uno de los tubos. Se agitó nuevamente vigorosamente durante 10 seg y se centrifugó a 5.000 rpm durante 2 min. Se dejó reposar durante 20 min a TA y se agregó a cada pocillo 105,5 μ l de la mezcla de transfección de siD7 y 105,0 μ l de la mezcla de siC completando a un volumen final de 1 ml con DMEM/F12 SBF al 1% sin antibiótico. Después de 6h se cambió el medio por medio completo (DMEM/F12 con SBF al 10% más antibiótico). Después de 48h de transfección con siD7, las células se transfectaron con 2,0 μ g del vector pLentiCx43-IRES-EGFP utilizando el reactivo de transfección Lipofectamina 2000. Al cumplirse las 90h de ensayo se extrajeron las proteínas con 150 μ L por pocillo de buffer Leammi 2X (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, glicerol 25%, 2% SDS más 50 μ L de β -mercaptoetanol (Sigma). Los extractos proteicos se reservaron para realizar los ensayos de Western blot.

MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Construcción de plásmidos

pLentiCx43: Este plásmido contiene el gen que codifica a la proteína Cx43 clonado en el plásmido lentiviral pLenti CMV TO puro empty (Addgene). Se obtuvo a

partir del ADNc de Cx43 clonado en el vector retroviral pLPCX-Cx43-IRES-EGFP, proporcionado por el Dr. Trond Aasen (Valld'Hebron Research Institute, Barcelona, España) el cual se amplificó mediante PCR con los cebadores: Forward: 5'TTC GAG GTC GAC GGT ATC3' y Reverse: 5'AAG AAA GTC TAG AGG TAC TAG ATC TCC AGG T3' que contienen sitios de restricción Sall y XbaI, respectivamente, subrayados. El producto amplificado se subclonó en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y posteriormente mediante las enzimas de restricción Sall (Invitrogen) y XbaI (Thermo Fisher) se digirió, el fragmento obtenido se purificó y se clonó en el vector lentiviral pLenti CMV TO puro empty para generar el plásmido pLentiCx43 (Ver Anexo II Tabla VIII).

pLentiCx43-IRES-EGFP: Este plásmido codifica a las proteínas Cx43 y EGFP (Proteína fluorescente verde). A partir del vector pLPCX-Cx43-IRES-EGFP se amplificó la secuencia IRES-EGFP con los cebadores: Forward: 5'TGG TTC TAG ATA TCG AAT TCC TGC3', que contienen el sitio de restricción XbaI (subrayado) y Reverse: 5'AGA TCT GAG TCA CTT GTA CAG CTC3'. El producto amplificado se subclonó en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y posteriormente mediante la enzima de restricción XbaI (Thermo Fisher) se digirió, el fragmento obtenido se purificó y se clonó en el vector lentiviral pLentiCx43 para generar el plásmido pLentiCx43-IRES-EGFP (Ver Anexo II Tabla VIII).

Preparación de bacterias competentes

Se utilizaron bacterias de la cepa *Escherichia Coli* Stbl3 que deriva de la cepa de *E. coli* HB101, la cual se recomienda para la amplificación de plásmidos que contienen insertos inestables como el ADN lentiviral con repeticiones directas. Para la amplificación de los plásmidos no lentivirales se utilizó la cepa *E. coli* DH5 α .

Preparación de bacterias electrocompetentes

Para poder introducir ADN foráneo con alta eficiencia dentro de las bacterias es necesario inducir el "estado de competencia" de las mismas. Para ello se partió de un stock de bacterias conservadas a -80°C, las cuales se repicaron en una placa conteniendo medio LB-Agar (Luria Bertani-Agar) y se incubaron toda la noche a 37°C. Luego, se tomó una colonia aislada y se incubó toda la noche a 37°C en 5 mL de medio

LB modificado (conteniendo 0,5% de NaCl). Posteriormente, se inocularon 100 mL de medio LB modificado con 2 mL del cultivo anterior y se incubó a 37°C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5 medida a 600 nm. El cultivo se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Las bacterias se colocaron en hielo durante 20 min. A partir de este momento el procedimiento se realizó manteniendo las células en hielo. El pellet de bacterias obtenido se resuspendió en 50 mL de agua mili Q estéril fría y se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min a 4°C. En condiciones de esterilidad, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron suavemente en 100 mL de glicerol al 10% en agua destilada estéril y se centrifugó en las mismas condiciones descritas anteriormente. Se descartó el sobrenadante y se repitió el paso anterior, pero esta vez las células se resuspendieron en 10 mL de glicerol al 10%. Finalmente las células se resuspendieron en 1 mL de glicerol al 10% en agua destilada estéril y se prepararon alícuotas de 40 µL que se almacenaron a -80°C hasta el momento de uso.

Transformación de bacterias por electroporación

En el proceso de electroporación, se somete a las bacterias a un campo eléctrico que desestabiliza la pared y la membrana celular, induciendo la formación de poros temporarios por los que ingresa el ADN a las bacterias. Para llevar a cabo este proceso se descongeló en hielo 50 µL de bacterias electrocompetentes y se agregó 1 µL del ADN plasmídico (no debe superar los 5 ng), incubando durante 1 minuto. La mezcla se colocó en una cubeta de electroporación estéril que se llevó al electroporador. Se aplicó un pulso eléctrico de 1,8 kV durante 20 mseg e inmediatamente después se agregaron 900 µL de medio LB y se transfirió las células a un tubo cónico estéril de 1,5 mL. Las células se incubaron durante 1h a 37°C con agitación. Finalmente se plaquearon las bacterias en medio LB-agar conteniendo el antibiótico apropiado para permitir la selección de las bacterias transformadas.

Preparación de bacterias competentes químicas

Se eligió una colonia bacteriana (2-3 mm de diámetro) de una placa que fue incubada durante 16-20 horas a 37°C. Luego se transfirió la colonia a 25 ml de medio

SOB (Super Optimal Broth) en un erlenmeyer de 250 ml. Posteriormente se incubó el cultivo durante 6-8 horas a 37°C con una agitación vigorosa (250-300 rpm). En últimas horas de la tarde se transvasó los 10 mL del cultivo inicial a un erlenmeyer de 1 L conteniendo 250 mL de LB y se incubó a 18-22°C con agitación moderada. Al día siguiente se determinó la absorbancia del medio a una OD= 600 hasta alcanzar una absorbancia de 0,55. Luego se llevó el erlenmeyer a un baño con hielo durante 10 min. Después, se centrifugó las células a 3900 rpm en un rotor Sorvall GSA durante 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante tratando de eliminar todo el líquido del pellet de bacterias. Luego, se resuspendió las células suavemente en 80 mL de buffer PIPES 0,5 M (pH 6.7) frío y se centrifugó nuevamente las células a 3900 rpm durante 10 min a 4°C. Al igual que en el paso anterior se descartó el sobrenadante tratando de eliminar todo el líquido del pellet de bacterias y se resuspendió las células suavemente en 20 ml de buffer PIPES 0,5 M (pH 6.7) frío. Se centrifugó y el pellet bacteriano se resuspendió en 1,5 mL de DMSO estéril, dejando reposar la suspensión de bacterias en hielo durante 10 min. Rápidamente, se dispensó la suspensión de bacterias en tubos cónicos estériles en alícuotas de 0,5 mL. Inmediatamente se congeló las células competentes sumergiendo los tubos bien cerrados en un baño de nitrógeno líquido. Se almacenó los tubos a -80°C hasta su uso.

Transformación de bacterias competentes químicas

Se descongelaron las bacterias competentes químicas y se dejaron en hielo durante 10 min. Luego se añadió el ADN transformante (hasta 25 ng por cada 50 µl de células competentes) en un volumen que no exceda el 5% del de las células competentes. Se agitó suavemente varias veces para mezclar bien el contenido y se dejó el tubo en hielo durante 30 min. Posteriormente se transfirió el tubo a un baño seco precalentado a 42°C durante 90 seg teniendo el cuidado de no agitar los tubos. Se transfirió rápidamente el tubo a un baño con hielo y se dejó enfriar las células durante 1-2 min. Se agregó 800 µl de medio SOC (*Super Optimal Broth with catabolite repression*) a cada tubo y se dejó en un baño seco a 37°C durante unos min. Después, se llevó los tubos a un agitador a 37°C y se dejó durante 45 min para permitir que las bacterias se recuperen y expresen el marcador de resistencia a los antibióticos

codificado por el plásmido. Finalmente, se transfirió un volumen apropiado de células competentes transformadas a un medio de agar SOB (*Super Optimal Broth*) que contenga 20 mM MgSO₄ y el antibiótico apropiado. Se dejó las placas a TA hasta que el líquido haya sido absorbido y se dejó la placa en una estufa a 37°C durante 12-16 horas.

Purificación de plásmidos

Para tal fin se cultivaron las bacterias conteniendo el plásmido de interés en un frasco de 5 mL de LB durante toda la noche a 37°C con agitación. Posteriormente, se centrifugó 1-3 ml de cultivo a 13.000 rpm durante 30 seg y se resuspendió el pellet celular en 100 µL de buffer de lisis mezclando por inversión 6 veces. Luego, se adicionó 350 µL de la solución de neutralización (4-8°C) y se mezcló vigorosamente por inversión. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 3 min. Posteriormente, se transfirió el sobrenadante a una minicolumna (miniprep, pure yield PROMEGA) sin remover el pellet y se centrifugó la minicolumna a 13.000 rpm durante 15 seg. Se lavó la minicolumna con 200 µL del buffer de lavado, centrifugando nuevamente a 13.000 rpm durante 15 seg. Se realizó, un último lavado con 400 µL de la solución de lavado y se centrifugó durante 30 seg. Finalmente, se realizó la elución del ADN plasmídico de la minicolumna con 40 µL de agua destilada, dejando reposar durante 1 minuto a TA y luego se centrifugó durante 15 seg a 13.000 rpm. El ADN plasmídico se conservó a -20°C.

Purificación de ARN total de células eucariotas

La extracción de ARN total de células eucariotas cultivadas sobre pocillos individuales de multiplacas de 6 pocillos se realizó utilizando 750 µL del reactivo TRIZOL (Invitrogen), el cual lisó las células produciendo la liberación del contenido celular. A la suspensión de células se le adicionó 150 µL de cloroformo y luego de 15 min de reposo a TA se centrifugó 15 min a 12.000 rpm a 4°C. El ARN presente en la fase acuosa superior se transfirió a un nuevo tubo y se lo precipitó con 350 µL de isopropanol durante 10 min a TA. Luego se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min. El pellet conteniendo el ARN precipitado se lavó con etanol 75% v/v, se secó a TA y se

resuspendió en agua libre de ARNasas (Ambion). La cuantificación del ARN se realizó mediante lectura espectrofotométrica a 260 nm (longitud de onda en la que las bases de los ácidos nucleicos poseen su máximo de absorbancia), sabiendo que 1 densidad óptica a 260 nm equivale a 40 µg/mL de ARN. La pureza de los ácidos nucleicos se calculó a través de la relación de absorbancia a 260 nm respecto a 280 nm (longitud de onda a la cual las proteínas poseen su máximo de absorbancia). Valores de relación de absorbancia entre 1,8 - 2,0 se consideraron adecuados para obtener un ARN de calidad. Las muestras se conservaron a -80°C hasta su utilización.

Reacción de transcriptasa reversa

La síntesis de ADNc se realizó a partir de 1 µg de ARN purificado en un volumen final de 20 µl. Alícuotas conteniendo 1 µg de ARN se incubaron con 1 U/µl de RNasin (PROMEGA), inhibidor de ARNasas, 2 µl de buffer de reacción 1X (Tris-HCl -pH 8,3- 50 mM, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM), 12,5 pmoles/µl de una mezcla de hexadesoxinucleótidos de secuencias al azar (iniciadores de la transcriptasa reversa), DTT (10 mM) y H₂O. La mezcla se incubó a 65°C durante 15 min para destruir estructuras secundarias. Posteriormente se agregaron 0,2 µl dNTPs 1 mM y la enzima M-MLV transcriptasa reversa 10 U/µl (Invitrogen) y se incubó 10 min a 25°C y luego 50 min a 37°C. Finalmente se inactivó la reacción incubando a 95°C durante 3 min.

Semi-cuantificación del ADNc mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los fragmentos de ADNc sintetizados por la reacción de la transcriptasa reversa se amplificaron por PCR. El número de ciclos utilizados se optimizó para que la amplificación de los transcritos se encontrase en el rango lineal. Los productos de amplificación se corrieron en geles de agarosa y se visualizaron utilizando SYBR safe.

El protocolo de amplificación para GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) incluyó: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, seguido por 22-24 ciclos (dependiendo de la abundancia del transcrito a amplificar) de 30 seg a 95°C, 30 seg a 60°C, 30 seg a 72°C y un ciclo de 10 min a 72°C. La secuencia (5' - 3') de oligonucleótidos empleados para amplificar GAPDH es: forward, GGT GAA GGT CGG

AGT CAA CG; reverse: GAT CTC GCT CCT GGA AGA TGG. Esta semi-cuantificación permitió verificar si los ARN eran amplificables antes de realizar la PCR en tiempo real.

Amplificación de ADNc cuantitativa por reacción en cadena de polimerasa a tiempo real (qPCR)

La amplificación a tiempo real se realizó utilizando el equipo de Applied Biosystems (ABI 7500 Real time PCR System) con el software de detección v1.4. Las condiciones de reacción, los primers y el tamaño de los fragmentos se seleccionaron para amplificar el transcripto de interés con eficiencias de amplificación comparables. Los experimentos se realizaron usando 1X de la mezcla comercial de PCR (SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems), con la concentración de primers detallados en la Tabla III del Anexo II y 5 μ l de una dilución 1/5 de ADNc en un volumen final de reacción de 15 μ l. El protocolo de ciclado empleado incluyó un paso de desnaturalización de 10 min a 95°C seguido de 40 ciclos de 15 seg a 95°C y a 60°C por 1 min. La especificidad se evaluó a través del análisis de las curvas de disociación. Cada muestra se analizó por triplicado y el nivel de expresión relativa de los transcriptos se calculó usando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando el transcripto de ciclofilina A como gen de referencia endógeno (Livak and Schmittgen, 2001). La eficiencia de amplificación se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula matemática:

$$E = [10^{(-1/p)} - 1] \times 100\%$$

donde “E” es la eficiencia y “p” es la pendiente de la curva de calibración de cada transcripto amplificado. Se consideró que la eficiencia era adecuada para la cuantificación cuando “E” se encontraba entre 90 y 110%, lo que equivale a una pendiente de -3,92 a -2,92.

MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS

Detección inmunológica de proteínas transferidas a soporte sólido: Western blot

Las muestras a analizar se prepararon en buffer de Laemmli (Tris-HCl mM pH: 6,8, glicerol 10%, SDS 2%, 2- β -mercaptoetanol 1% y azul de bromofenol 0,002%), luego se calentaron 5 min a 90°C en baño seco. Las proteínas se separaron en geles de

poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS) al 10%, durante 60 min a 150 V en buffer de corrida (25 mM de Tris-base, 192 mM de glicina y 1% de SDS p/v). Una vez terminada la corrida electroforética, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences) mediante transferencia húmeda (buffer de transferencia Tris-HCl 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0,0375% p/v, metanol 20% v/v, pH: 9,2) durante 60 min a 100 V. Posteriormente, la membrana se tiñó con rojo Ponceau (Rojo Ponceau 0,2%, ácido tricloroacético 3%, ácido sulfosalicílico 3%) y se enjuagó con abundante agua destilada. El perfil proteico obtenido permite determinar la cantidad y calidad de la transferencia de las proteínas a la membrana. Finalmente, la membrana se decoloró mediante lavados con TBS 1X (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM pH: 7,8), y se bloqueó con leche descremada 5% p/v en TBS 0,2% v/v Tween-20 (TBS-T) durante 1h a TA, con agitación. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario durante 1 h a TA, o toda la noche a 4°C con agitación. Los anticuerpos primarios se diluyeron en TBS o en leche 5% p/v en TBS. Luego, se realizaron 2 lavados de 5 min con TBS-T 0,02% y agitación y un lavado con TBS y agitación. La membrana se incubó 1h a TA con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado anti-IgG de conejo (IRDye 800CW) o anti-IgG de ratón (IRDye 680CW) (LI-COR) dilución 1/15000 en TBS durante 1h a TA con agitación suave. Alternativamente, las membranas se incubaron con los anticuerpo secundario anti-IgG de ratón HRP o anti-IgG de conejo HRP dilución 1/10000, durante 1h a TA con agitación. Por último se realizaron 2 lavados con TBS-T 0,02% y dos lavados con TBS, ambos con agitación. La señal se observó y analizó en el equipo lector Odyssey Clx a través del programa Image Studio o mediante quimioluminiscencia. Las características generales de los anticuerpos primarios y secundarios empleados en los ensayos de Western blot y detalles experimentales se detallan en las Tablas IV y V del Anexo II, respectivamente.

Inmunofluorescencia

Las células se crecieron sobre cubreobjetos estériles dispuestos dentro de las placas de cultivo. Luego de transcurrido el tiempo necesario acorde al experimento realizado, se levantaron los cubreobjetos con las células adheridas y se colocaron en una cámara húmeda; se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con metanol durante 20

min a 4°C. Luego, las células se permeabilizaron con Tritón X-100 0,01% v/v en PBS durante 7 min y se realizaron 3 lavados con PBS (2 min cada lavado). Para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos primarios se efectuaron 2 bloqueos de 15 min cada uno a TA, el primero con PBS 0,2% v/v Tween-20 (PBS-T) conteniendo 2,5% v/v de suero de cabra (Sigma Co.), y el otro con PBS-T conteniendo 0,4% de gelatina de piel de pescado (Sigma Co.). Posteriormente, se incubaron los cubreobjetos con 40 µL de los anticuerpos primarios (Ver Tabla VI del Anexo II) diluidos en gelatina de piel de pescado, durante 1 h a 37°C. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS-T (5 min c/u). A continuación se incubaron los cubreobjetos con 40 µL del anticuerpo secundario adecuado diluido en suero de cabra durante 1h a 37°C y posteriormente se tiñeron los núcleos con Hoechst diluido en PBS durante 20 min a TA. Luego se realizaron 3 lavados de 5 min c/u con PBS-T. Por último se enjuagaron los cubreobjetos con agua y se montaron sobre un portaobjeto empleando una gota Mowiol (Sigma Co.). Las muestras se conservaron a 4°C hasta el momento de su análisis. El análisis de las imágenes de inmunofluorescencia se realizó en el microscopio invertido a 40X (NIKON Eclipse TE 2000U) o microscopio confocal Olympus FLuoview FV300 (Olympus Latin America, Miami, FL), según se indica.

Tinción de las mitocondrias con MitoTracker Deep Red

En una placa de 12 pocillos se colocaron vidrios cubreobjetos y luego se plaquearon 15.000 células. Al día siguiente se controló que las células se hayan adherido correctamente al vidrio. Posteriormente se preparó una dilución 1/2000 de MitoTracker Deep Red (Invitrogen, M-7514) (solución madre 1 mM) en DMEM suplementado con SFB al 10%. A cada pocillo se le agregó 300 µL de esta solución y se incubó durante 10 min a 37°C. Después las células se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído frío durante 20 min a TA. Se tiñeron los núcleos con DAPI diluido en PBS durante 20 min a TA. Posteriormente los cubreobjetos se montaron en portaobjetos de vidrio con medio de montaje. Las preparaciones se sellaron y se almacenaron en la oscuridad a 4°C.

Zimografía

Para evaluar la actividad gelatinolítica de proteasas en sobrenadantes de cultivos celulares, se emplearon ensayos de zimografía en PAGE-SDS copolimerizada con gelatina al 1,5 mg/mL como sustrato. Para tal fin, las células HTR-8/SVneo se transfectaron con siD7 o siC y se cultivaron durante 72h. Dieciocho horas antes de finalizar el tiempo de transfección se cambió el medio completo (DMEM/F12, SFB 10%, antibióticos) por un medio sin suero para evitar la valoración de las metaloproteasas presentes en el suero. Al cumplirse las 72h del ensayo, se recogió el sobrenadante en un tubo cónico y se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min para separar del medio las células muertas e impurezas, transvasando el sobrenadante a otro tubo evitando arrastrar algo del precipitado. Se guardó las muestras a -20°C hasta su uso.

Para la preparación de las muestras para la corrida electroforética se tomaron 30 µL de sobrenadante de cultivo y se agregó 3 µL de buffer de muestra 5X (Tris-HCl 0,5 M pH: 6,8, glicerol 20%, SDS 4%, 0,02 M azul de bromofenol). Se utilizó como control positivo sangre capilar a la cual se le agregó 10 µL de buffer de muestra 5X por cada 40 µL de sangre, para evitar la coagulación. De los 50 µL finales del control positivo solo se sembraron 8 µL. También es necesario sembrar un marcador de peso molecular.

La preparación del gel se realizó de la misma manera que para los ensayos de Western blot adicionando 1,5% de gelatina (Sigma G 9382) al gel separador. La corrida se realizó a 100 V durante 1,5 -2h en hielo para evitar el aumento de temperatura del buffer de corrida, lo cual podría inactivar las enzimas. Es recomendable detener la corrida antes de que salga el frente de corrida ya que su color permite controlar la correcta ejecución de los pasos siguientes. Una vez terminada la corrida se realizó un lavado de 15 min con una solución de Tritón (200 mL de H₂O + 5 mL de Tritón X-100) con agitación. Luego se realizó 2 lavados de 5 min con H₂O destilada y 3 lavados de 5 min cada uno con el buffer de la enzima (0,05M Tris; 0,2M NaCl, 6,8 mM CaCl₂·2H₂O, pH: 7,5-7,6). Finalizada la corrida electroforética se incubó el gel con el buffer de la enzima durante 24 – 48h sin agitación a 37°C. Posteriormente, se realizaron varios lavados de 5 min con agua destilada. Luego se realizó la coloración del gel con azul de Coomassie (0,1 mM azul brillante de Coomassie, 25% etanol absoluto y 10% ácido acético) hasta visualizar las bandas claras indicativo de la actividad enzimática.

Finalmente, se lavó con la solución de decoloración (ácido acético 10%, 25% de etanol absoluto) hasta visualizar las bandas proteicas correspondientes a la actividad gelatinolítica.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los datos en los gráficos de este trabajo de tesis son presentados como el promedio de las mediciones con su respectivo error estándar de la media (SEM). En general se hicieron un mínimo de tres experimentos independientes. El número específico de la cantidad de datos utilizados para la estadística se especifica en la leyenda de cada figura junto con el tipo de análisis implementado. Se consideró como valor de significancia $p \leq 0,001$ ó $\leq 0,05$, según los datos. Todos los gráficos fueron realizados empleando el software GraphPad Prism versión 5.01.

ANEXO II

Tabla III. Secuencia y concentración de los cebadores empleados en los ensayos de qRT-PCR

| Transcripto/Proteína | Secuencia 5'-3' | Concentración (nM) |
|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------|
| <i>StarD7</i> / <i>StarD7</i> | F: GGTAATCAAGCTGGAGGTGATTG | 100 |
| | R: GAGTACATTGGATAAGGAAAATGGGT | 100 |
| <i>PPIA</i> / <i>Ciclofilina A</i> | F: GTCAACCCCACCGTGTCTT | 200 |
| | R: CTGCTGTCTTTGGGACCTTGT | 200 |
| <i>IGTA5</i> / <i>Integrina α5</i> | F: TGCAGTGTGAGGCTGTGTACA | 300 |
| | R: GTGGCCACCTGACGCTCT | 300 |
| <i>IGTA1</i> / <i>Integrina α1</i> | F: GAAGGGTTGCCCTCCAGA | 200 |
| | R: GCTTGAGCTTCTCTGCTGTT | 200 |
| <i>IGTAB1</i> / <i>Integrina β1</i> | F: ACTTGCCTTTTCATTTACTTC | 300 |
| | R: GCTTGAGCTTCTCTGCTGTT | 300 |
| <i>Gja1</i> / <i>Conexina 43</i> | F: ACTTGCCTTTTCATTTACTTC | 300 |
| | R: CCTGGGCACCACTCTTTT | 300 |
| <i>NID1</i> / <i>Nidogen-1</i> | F: CTGGAGGACGGGGATGACTT | 200 |
| | R: CGGGGGTTCACTCGTAGCAA | 200 |

Tabla IV. Características generales de los anticuerpos primarios empleados en los ensayos de Western blot y detalles experimentales.

| Proteína | Anticuerpo Especie/Compañía | Dilución |
|---------------------|---|----------|
| <i>StarD7</i> | Policlonal de conejo (0,5 µg/ml)/ nuestro laboratorio | 1/500 |
| <i>Conexina 43</i> | Policlonal de conejo/ Sigma Co. | 1/2500 |
| α -tubulina | Monoclonal (Clone B-5-1-2) de ratón/Sigma Co. | 1/2000 |
| <i>Integrina α5</i> | Policlonal de conejo (sc-10729)/Santa Cruz Biotech. | 1/350 |
| <i>Integrina β1</i> | Policlonal de ratón (sc-374429)/Santa Cruz Biotech. | 1/300 |
| β -Catenina | Policlonal de ratón/Santa Cruz Biotech. | 1/500 |
| <i>Nidogen-1</i> | Monoclonal de ratón (302117)/Sigma Co. | 1/300 |
| <i>Twist1</i> | Monoclonal de ratón (#81417)/Santa Cruz Biotech. | 1/300 |

Tabla V. Características generales de los anticuerpos secundarios empleados en los ensayos de Western blot y detalles experimentales.

| Anticuerpo secundario | Dilución | Compañía |
|--------------------------------|-----------------|-------------------|
| Anti-IgG de conejo IRDye 800CW | 1/15000 | LiCor Biosciences |
| Anti-IgG de ratón IRDye 680CW | 1/15000 | LiCor Biosciences |
| Anti- IgG de ratón HRP | 1/10000 | Life Technologies |
| Anti-IgG de conejo HRP | 1/10000 | Life Technologies |

Tabla VI. Características generales de los anticuerpos primarios empleados en los ensayos de inmunofluorescencia y detalles experimentales

| Proteína | Anticuerpo (Especie/Compañía) | Dilución |
|----------------------|---|-----------------|
| Conexina 43 | Policlonal de conejo/ Sigma Co. | 1/50 |
| Integrina α 5 | Policlonal de conejo (sc-10729)/Santa Cruz Biotech | 1/80 |
| Integrina α 1 | Policlonal de ratón A-9 (sc-271034)/Santa Cruz Biotech. | 1/50 |
| GM130 | Monoclonal de ratón (610823)/BD Transduction Lab. | 1/200 |
| Golgina 97 | Monoclonal de ratón (A-21270)/Molecular probes) | 1/200 |
| γ -tubulina | Monoclonal de ratón clone (GTU-88)/Sigma Co. | 1/3000 |

Tabla VII. Características generales de los anticuerpos secundarios empleados en los ensayos de inmunofluorescencia y detalles experimentales

| Anticuerpo secundario | Dilución | Compañía |
|------------------------------------|-----------------|-------------------|
| Alexa Fluor 488 anti-IgG de conejo | 1/720 | Life Technologies |
| Alexa Fluor 594 anti-IgG de ratón | 1/720 | Life Technologies |

Tabla VIII. Características generales de los plásmidos empleados

| Plásmido | Vector | Origen |
|----------------------|---|-------------------------------|
| pLenti-CMV-TO | Vector viral para la expresión y depleción de proteínas en células de mamíferos. | Addgene |
| pLenti StarD7.I | pLenti-CMV-TO conteniendo la secuencia del gen que codifica a StarD7.I La secuencia se amplificó a partir del vector pcDNA3.1-StarD7.I con los oligonucleótidos: forward: 5`GAA CCC ACT <u>AGTC GAC</u> TTA CTG GCT TAT CGA A3`y reverse: 5`ATC TGC <u>AGT CTA</u> GAT CAA GCA TAC TCA ATC CG3`y se clonó en los sitios Sall y Xbal de pLenti CMV TO. | Construido en el laboratorio |
| pCR2.1-TOPO | Vector de clonado para productos de PCR. | Promega |
| pcDNA3.1-StarD7.I | pcDNA3.1 conteniendo la secuencia que codifica al gen StarD7.I. | (Horibata and Sugimoto, 2010) |
| pLPCX-Cx43-IRES-EGFP | Vector pLPCX para transfección o infección retroviral de células de mamíferos conteniendo los genes que expresan Cx43 y EGFP separadamente. | (Salat-Canela et al., 2014) |
| pLentiCx43-IRES-EGFP | pLenti-CMV-TO para transfección o infección viral de células de mamíferos conteniendo los genes que expresan Cx43 y EGFP separadamente. | Construido en este trabajo |
| pLentiCx43 | pLenti-CMV-TO para transfección o infección viral de células de mamíferos conteniendo el gen que expresa Cx43. | Construido en este trabajo |
| pSPAX2 | Plásmido de empaquetamiento lentiviral de 2da. Generación. | Addgene |
| pMD2.G | Plásmido que expresa la proteína de cubierta VSV-G. | Addgene |

BIBLIOGRAFÍA

-
- Aasen, T. 2015. Connexins: junctional and non-junctional modulators of proliferation. *Cell and tissue research*. 360:685-699.
- Aasen, T., E. Leithe, S.V. Graham, P. Kameritsch, M.D. Mayan, M. Mesnil, K. Pogoda, and A. Tabernero. 2019a. Connexins in cancer: bridging the gap to the clinic. *Oncogene*. 38:4429-4451.
- Aasen, T., I. Sansano, M.A. Montero, C. Romagosa, J. Temprana-Salvador, A. Martinez-Marti, T. Moline, J. Hernandez-Losa, and S. Ramon y Cajal. 2019b. Insight into the Role and Regulation of Gap Junction Genes in Lung Cancer and Identification of Nuclear Cx43 as a Putative Biomarker of Poor Prognosis. *Cancers*. 11.
- Abdel Rahman, A.M., M. Ryczko, M. Nakano, J. Pawling, T. Rodrigues, A. Johswich, N. Taniguchi, and J.W. Dennis. 2015. Golgi N-glycan branching N-acetylglucosaminyltransferases I, V and VI promote nutrient uptake and metabolism. *Glycobiology*. 25:225-240.
- Abraham, V., M.L. Chou, P. George, P. Pooler, A. Zaman, R.C. Savani, and M. Koval. 2001. Heterocellular gap junctional communication between alveolar epithelial cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 280:L1085-1093.
- Aleckovic, M., Y. Wei, G. LeRoy, S. Sidoli, D.D. Liu, B.A. Garcia, and Y. Kang. 2017. Identification of Nidogen 1 as a lung metastasis protein through secretome analysis. *Genes & development*. 31:1439-1455.
- Alpy, F., and C. Tomasetto. 2014. START ships lipids across interorganelle space. *Biochimie*. 96:85-95.
- Anderson, C., H. Catoe, and R. Werner. 2006. MIR-206 regulates connexin43 expression during skeletal muscle development. *Nucleic acids research*. 34:5863-5871.
- Andzelm, M.M., T.J. Cherry, D.A. Harmin, A.C. Boeke, C. Lee, M. Hemberg, B. Pawlyk, A.N. Malik, S.W. Flavell, M.A. Sandberg, E. Raviola, and M.E. Greenberg. 2015. MEF2D drives photoreceptor development through a genome-wide competition for tissue-specific enhancers. *Neuron*. 86:247-263.
- Angeletti, S., B. Maggio, and S. Genti-Raimondi. 2004. Surface activity and interaction of StarD7 with phospholipid monolayers. *Biochemical and biophysical research communications*. 314:181-185.
- Angeletti, S., V. Rena, R. Nores, R. Fretes, G.M. Panzetta-Dutari, and S. Genti-Raimondi. 2008. Expression and localization of StarD7 in trophoblast cells. *Placenta*. 29:396-404.
- Angeletti, S., J.M. Sanchez, L.W. Chamley, S. Genti-Raimondi, and M.A. Perillo. 2012. StarD7 behaves as a fusogenic protein in model and cell membrane bilayers. *Biochimica et biophysica acta*. 1818:425-433.
- Ansieau, S., A.P. Morel, G. Hinkal, J. Bastid, and A. Puisieux. 2010. TWISTing an embryonic transcription factor into an oncoprotein. *Oncogene*. 29:3173-3184.
- Baloyannis, S.J. 2011. Mitochondria are related to synaptic pathology in Alzheimer's disease. *International journal of Alzheimer's disease*. 2011:305395.
- Bao, L., Y. Zhang, J. Wang, H. Wang, N. Dong, X. Su, M. Xu, and X. Wang. 2016. Variations of chromosome 2 gene expressions among patients with lung cancer or non-cancer. *Cell biology and toxicology*. 32:419-435.
- Basheer, W., and R. Shaw. 2016. The "tail" of Connexin43: An unexpected journey from alternative translation to trafficking. *Biochimica et biophysica acta*. 1863:1848-1856.
- Bates, D.C., W.C. Sin, Q. Aftab, and C.C. Naus. 2007. Connexin43 enhances glioma invasion by a mechanism involving the carboxy terminus. *Glia*. 55:1554-1564.
- Beardslee, M.A., D.L. Lerner, P.N. Tadros, J.G. Laing, E.C. Beyer, K.A. Yamada, A.G. Kleber, R.B. Schuessler, and J.E. Saffitz. 2000. Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by ischemia. *Circulation research*. 87:656-662.
-

- Bershadsky, A.D., and A.H. Futerman. 1994. Disruption of the Golgi apparatus by brefeldin A blocks cell polarization and inhibits directed cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:5686-5689.
- Bhat, A.A., S. Uppada, I.W. Achkar, S. Hashem, S.K. Yadav, M. Shanmugakonar, H.A. Al-Naemi, M. Haris, and S. Uddin. 2018. Tight Junction Proteins and Signaling Pathways in Cancer and Inflammation: A Functional Crosstalk. *Frontiers in physiology*. 9:1942.
- Blanco, F.J., I. Rego, and C. Ruiz-Romero. 2011. The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nature reviews. Rheumatology*. 7:161-169.
- Bockelmann, S., J.G.M. Mina, S. Korneev, D.G. Hassan, D. Muller, A. Hilderink, H.C. Vlieg, R. Rajmakers, A.J.R. Heck, P. Haberkant, and J.C.M. Holthuis. 2018. A search for ceramide binding proteins using bifunctional lipid analogs yields CERT-related protein StarD7. *Journal of lipid research*. 59:515-530.
- Boengler, K., G. Dodoni, A. Rodriguez-Sinovas, A. Cabestrero, M. Ruiz-Meana, P. Gres, I. Konietzka, C. Lopez-Iglesias, D. Garcia-Dorado, F. Di Lisa, G. Heusch, and R. Schulz. 2005. Connexin 43 in cardiomyocyte mitochondria and its increase by ischemic preconditioning. *Cardiovascular research*. 67:234-244.
- Bossers, K., K.T. Wirz, G.F. Meerhoff, A.H. Essing, J.W. van Dongen, P. Houba, C.G. Kruse, J. Verhaagen, and D.F. Swaab. 2010. Concerted changes in transcripts in the prefrontal cortex precede neuropathology in Alzheimer's disease. *Brain : a journal of neurology*. 133:3699-3723.
- Campbell, I.D., and M.J. Humphries. 2011. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 3.
- Cardenas, J., S. Rivero, B. Goud, M. Bornens, and R.M. Rios. 2009. Golgi localisation of GMAP210 requires two distinct cis-membrane binding mechanisms. *BMC biology*. 7:56.
- Clark, B.J. 2020. The START-domain proteins in intracellular lipid transport and beyond. *Molecular and cellular endocrinology*. 504:110704.
- Clauss, S.B., D.L. Walker, M.L. Kirby, D. Schimel, and C.W. Lo. 2006. Patterning of coronary arteries in wildtype and connexin43 knockout mice. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 235:2786-2794.
- Cogliati, B., M. Vinken, T.C. Silva, C.M.M. Araujo, T.P.A. Aloia, L.M. Chaible, C.M.C. Mori, and M.L.Z. Dagli. 2015. Connexin 43 deficiency accelerates skin wound healing and extracellular matrix remodeling in mice. *Journal of dermatological science*. 79:50-56.
- Cohen, M., and P. Bischof. 2007. Factors regulating trophoblast invasion. *Gynecologic and obstetric investigation*. 64:126-130.
- Corthesy-Theulaz, I., A. Pauloin, and S.R. Pfeffer. 1992. Cytoplasmic dynein participates in the centrosomal localization of the Golgi complex. *The Journal of cell biology*. 118:1333-1345.
- Crespin, S., G. Fromont, M. Wager, P. Levillain, L. Cronier, A. Monvoisin, N. Defamie, and M. Mesnil. 2016. Expression of a gap junction protein, connexin43, in a large panel of human gliomas: new insights. *Cancer medicine*. 5:1742-1752.
- Cronier, L., S. Crespin, P.O. Strale, N. Defamie, and M. Mesnil. 2009. Gap junctions and cancer: new functions for an old story. *Antioxidants & redox signaling*. 11:323-338.
- Cronier, L., N. Defamie, L. Dupays, M. Theveniau-Ruissy, F. Goffin, G. Pointis, and A. Malassine. 2002. Connexin expression and gap junctional intercellular communication in human first trimester trophoblast. *Molecular human reproduction*. 8:1005-1013.
- Danen, E.H., and A. Sonnenberg. 2003. Integrins in regulation of tissue development and function. *The Journal of pathology*. 201:632-641.
- de Wilde, J., R. Mohren, S. van den Berg, M. Boekschoten, K.W. Dijk, P. de Groot, M. Muller, E. Mariman, and E. Smit. 2008. Short-term high fat-feeding results in morphological and

- metabolic adaptations in the skeletal muscle of C57BL/6J mice. *Physiological genomics*. 32:360-369.
- Ding, X., F. Li, and L. Zhang. 2019. Knockdown of Delta-like 3 restricts lipopolysaccharide-induced inflammation, migration and invasion of A2058 melanoma cells via blocking Twist1-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Life sciences*. 226:149-155.
- Dunk, C.E., A. Gellhaus, S. Drewlo, D. Baczyk, A.J. Potgens, E. Winterhager, J.C. Kingdom, and S.J. Lye. 2012. The molecular role of connexin 43 in human trophoblast cell fusion. *Biology of reproduction*. 86:115.
- Durand, S., S. Angeletti, and S. Genti-Raimondi. 2004. GTT1/StarD7, a novel phosphatidylcholine transfer protein-like highly expressed in gestational trophoblastic tumour: cloning and characterization. *Placenta*. 25:37-44.
- Egea, G., C. Serra-Peinado, L. Salcedo-Sicilia, and E. Gutierrez-Martinez. 2013. Actin acting at the Golgi. *Histochemistry and cell biology*. 140:347-360.
- Elbadawy, H.M.M., P.; Graham, A. 2015. Lipid metabolism and gene expression profiles of START domain protein family during the differentiation of keratinocytes
- Epifantseva, I., and R.M. Shaw. 2018. Intracellular trafficking pathways of Cx43 gap junction channels. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*. 1860:40-47.
- Esseltine, J.L., Q. Shao, T. Huang, J.J. Kelly, J. Sampson, and D.W. Laird. 2015. Manipulating Cx43 expression triggers gene reprogramming events in dermal fibroblasts from oculodentodigital dysplasia patients. *The Biochemical journal*. 472:55-69.
- Falk, M.M., R.M. Kells, and V.M. Berthoud. 2014. Degradation of connexins and gap junctions. *FEBS letters*. 588:1221-1229.
- Farber-Katz, S.E., H.C. Dippold, M.D. Buschman, M.C. Peterman, M. Xing, C.J. Noakes, J. Tat, M.M. Ng, J. Rahajeng, D.M. Cowan, G.J. Fuchs, H. Zhou, and S.J. Field. 2014. DNA damage triggers Golgi dispersal via DNA-PK and GOLPH3. *Cell*. 156:413-427.
- Farhan, H., M.W. Wendeler, S. Mitrovic, E. Fava, Y. Silberberg, R. Sharan, M. Zerial, and H.P. Hauri. 2010. MAPK signaling to the early secretory pathway revealed by kinase/phosphatase functional screening. *The Journal of cell biology*. 189:997-1011.
- Feng, M.Y., K. Wang, H.T. Song, H.W. Yu, Y. Qin, Q.T. Shi, and J.S. Geng. 2009. Metastasis-induction and apoptosis-protection by TWIST in gastric cancer cells. *Clinical & experimental metastasis*. 26:1013-1023.
- Ferraro, D.A., F. Patella, S. Zanivan, C. Donato, N. Aceto, M. Giannotta, E. Dejana, M. Diepenbruck, G. Christofori, and M. Buess. 2019. Endothelial cell-derived nidogen-1 inhibits migration of SK-BR-3 breast cancer cells. *BMC cancer*. 19:312.
- Filadi, R., E. Greotti, G. Turacchio, A. Luini, T. Pozzan, and P. Pizzo. 2015. Mitofusin 2 ablation increases endoplasmic reticulum-mitochondria coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 112:E2174-2181.
- Flores-Martin, J. 2015. Caracterización funcional de la proteína StarD7: aspectos bioquímicos, celulares y moleculares. *In Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Químicas. UNC*
- Flores-Martin, J., V. Rena, S. Angeletti, G.M. Panzetta-Dutari, and S. Genti-Raimondi. 2013. The Lipid Transfer Protein StarD7: Structure, Function, and Regulation. *Int J Mol Sci*. 14:6170-6186.
- Flores-Martin, J., V. Rena, S. Marquez, G.M. Panzetta-Dutari, and S. Genti-Raimondi. 2012. StarD7 knockdown modulates ABCG2 expression, cell migration, proliferation, and differentiation of human choriocarcinoma JEG-3 cells. *PLoS one*. 7:e44152.
- Flores-Martin, J., L. Reyna, M. Cruz Del Puerto, M.L. Rojas, G.M. Panzetta-Dutari, and S. Genti-Raimondi. 2018. Hexosamine pathway regulates StarD7 expression in JEG-3 cells. *Molecular biology reports*. 45:2593-2600.
- Flores-Martin, J., L. Reyna, M.E. Ridano, G.M. Panzetta-Dutari, and S. Genti-Raimondi. 2016. Suppression of StarD7 promotes endoplasmic reticulum stress and induces ROS production. *Free radical biology & medicine*. 99:286-295.

- Fox, J.W., U. Mayer, R. Nischt, M. Aumailley, D. Reinhardt, H. Wiedemann, K. Mann, R. Timpl, T. Krieg, J. Engel, and et al. 1991. Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. *The EMBO journal*. 10:3137-3146.
- Francis, R., X. Xu, H. Park, C.J. Wei, S. Chang, B. Chatterjee, and C. Lo. 2011. Connexin43 modulates cell polarity and directional cell migration by regulating microtubule dynamics. *PLoS one*. 6:e26379.
- Gago-Fuentes, R., P. Fernandez-Puente, D. Megias, P. Carpintero-Fernandez, J. Mateos, B. Acea, E. Fonseca, F.J. Blanco, and M.D. Mayan. 2015. Proteomic Analysis of Connexin 43 Reveals Novel Interactors Related to Osteoarthritis. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 14:1831-1845.
- Garcia, A.J., J. Takagi, and D. Boettiger. 1998. Two-stage activation for alpha5beta1 integrin binding to surface-adsorbed fibronectin. *The Journal of biological chemistry*. 273:34710-34715.
- Gleeson, L.M., C. Chakraborty, T. McKinnon, and P.K. Lala. 2001. Insulin-like growth factor-binding protein 1 stimulates human trophoblast migration by signaling through alpha 5 beta 1 integrin via mitogen-activated protein Kinase pathway. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 86:2484-2493.
- Gotlieb, A.I., L. Subrahmanyam, and V.I. Kalnins. 1983. Microtubule-organizing centers and cell migration: effect of inhibition of migration and microtubule disruption in endothelial cells. *The Journal of cell biology*. 96:1266-1272.
- Guizzunti, G., and J. Seemann. 2016. Mitotic Golgi disassembly is required for bipolar spindle formation and mitotic progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 113:E6590-E6599.
- Haberkant, P., R. Raijmakers, M. Wildwater, T. Sachsenheimer, B. Brugger, K. Maeda, M. Houweling, A.C. Gavin, C. Schultz, G. van Meer, A.J. Heck, and J.C. Holthuis. 2013. In vivo profiling and visualization of cellular protein-lipid interactions using bifunctional fatty acids. *Angewandte Chemie*. 52:4033-4038.
- Hammond, S.M. 2015. An overview of microRNAs. *Advanced drug delivery reviews*. 87:3-14.
- Hang, Q., T. Isaji, S. Hou, Y. Wang, T. Fukuda, and J. Gu. 2017. A Key Regulator of Cell Adhesion: Identification and Characterization of Important N-Glycosylation Sites on Integrin alpha5 for Cell Migration. *Molecular and cellular biology*. 37.
- Hao, H., D.S. Kim, B. Klocke, K.R. Johnson, K. Cui, N. Gotoh, C. Zang, J. Gregorski, L. Gieser, W. Peng, Y. Fann, M. Seifert, K. Zhao, and A. Swaroop. 2012. Transcriptional regulation of rod photoreceptor homeostasis revealed by in vivo NRL targetome analysis. *PLoS genetics*. 8:e1002649.
- Hao, H., J. Niu, B. Xue, Q.P. Su, M. Liu, J. Yang, J. Qin, S. Zhao, C. Wu, and Y. Sun. 2020. Golgi-associated microtubules are fast cargo tracks and required for persistent cell migration. *EMBO reports*. 21:e48385.
- Harris, L.K., C.J. Jones, and J.D. Aplin. 2009. Adhesion molecules in human trophoblast - a review. II. extravillous trophoblast. *Placenta*. 30:299-304.
- He, X., and Q. Chen. 2016. Reduced expressions of connexin 43 and VEGF in the first-trimester tissues from women with recurrent pregnancy loss. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 14:46.
- Horibata, Y., H. Ando, M. Satou, H. Shimizu, S. Mitsuhashi, Y. Shimizu, M. Itoh, and H. Sugimoto. 2017. Identification of the N-terminal transmembrane domain of StarD7 and its importance for mitochondrial outer membrane localization and phosphatidylcholine transfer. *Scientific reports*. 7:8793.
- Horibata, Y., H. Ando, P. Zhang, L. Vergnes, C. Aoyama, M. Itoh, K. Reue, and H. Sugimoto. 2016. StarD7 Protein Deficiency Adversely Affects the Phosphatidylcholine

- Composition, Respiratory Activity, and Cristae Structure of Mitochondria. *The Journal of biological chemistry*. 291:24880-24891.
- Horibata, Y., S. Mitsuhashi, H. Shimizu, S. Maejima, H. Sakamoto, C. Aoyama, H. Ando, and H. Sugimoto. 2020. The phosphatidylcholine transfer protein StarD7 is important for myogenic differentiation in mouse myoblast C2C12 cells and human primary skeletal myoblasts. *Scientific reports*. 10:2845.
- Horibata, Y., and H. Sugimoto. 2010. StarD7 mediates the intracellular trafficking of phosphatidylcholine to mitochondria. *The Journal of biological chemistry*. 285:7358-7365.
- Hornbeck, P.V., J.M. Kornhauser, S. Tkachev, B. Zhang, E. Skrzypek, B. Murray, V. Latham, and M. Sullivan. 2012. PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse. *Nucleic acids research*. 40:D261-270.
- Hou, X., M.R.A. Khan, M. Turmaine, C. Thrasivoulou, D.L. Becker, and A. Ahmed. 2019. Wnt signaling regulates cytosolic translocation of connexin 43. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 317:R248-R261.
- Huang, G.Y., E.S. Cooper, K. Waldo, M.L. Kirby, N.B. Gilula, and C.W. Lo. 1998. Gap junction-mediated cell-cell communication modulates mouse neural crest migration. *The Journal of cell biology*. 143:1725-1734.
- Humphries, M.J. 2009. Cell adhesion assays. *Methods in molecular biology*. 522:203-210.
- Iacobas, D.A., M. Urban-Maldonado, S. Iacobas, E. Scemes, and D.C. Spray. 2003. Array analysis of gene expression in connexin-43 null astrocytes. *Physiological genomics*. 15:177-190.
- Iacobas, S., D.A. Iacobas, D.C. Spray, and E. Scemes. 2012. The connexin43-dependent transcriptome during brain development: importance of genetic background. *Brain research*. 1487:131-139.
- Ikeda, Y., E. Tanji, N. Makino, S. Kawata, and T. Furukawa. 2012. MicroRNAs associated with mitogen-activated protein kinase in human pancreatic cancer. *Molecular cancer research : MCR*. 10:259-269.
- Jayadev, R., and D.R. Sherwood. 2017. Basement membranes. *Current biology : CB*. 27:R207-R211.
- Jelinek, D.F., R.C. Tschumper, G.A. Stolovitzky, S.J. Iturria, Y. Tu, J. Lepre, N. Shah, and N.E. Kay. 2003. Identification of a global gene expression signature of B-chronic lymphocytic leukemia. *Molecular cancer research : MCR*. 1:346-361.
- Jerez-Timaure, N.C., F. Kearney, E.B. Simpson, E.J. Eisen, and D. Pomp. 2004. Characterization of QTL with major effects on fatness and growth on mouse chromosome 2. *Obesity research*. 12:1408-1420.
- Kadl, A., A.K. Meher, P.R. Sharma, M.Y. Lee, A.C. Doran, S.R. Johnstone, M.R. Elliott, F. Gruber, J. Han, W. Chen, T. Kensler, K.S. Ravichandran, B.E. Isakson, B.R. Wamhoff, and N. Leitinger. 2010. Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. *Circulation research*. 107:737-746.
- Kadry, Y.A., and D.A. Calderwood. 2020. Chapter 22: Structural and signaling functions of integrins. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*:183206.
- Kameritsch, P., K. Pogoda, and U. Pohl. 2012. Channel-independent influence of connexin 43 on cell migration. *Biochimica et biophysica acta*. 1818:1993-2001.
- Khan, M.A., H.C. Chen, D. Zhang, and J. Fu. 2013. Twist: a molecular target in cancer therapeutics. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 34:2497-2506.
- Kim, S.N., H.J. Kwon, S.W. Im, Y.H. Son, S. Akindihin, Y.S. Jung, S.J. Lee, I.J. Rhyu, I.Y. Kim, J.K. Seong, J. Lee, H.C. Yoo, J.G. Granneman, and Y.H. Lee. 2017. Connexin 43 is required for the maintenance of mitochondrial integrity in brown adipose tissue. *Scientific reports*. 7:7159.

- Kim, W., E.J. Bennett, E.L. Huttlin, A. Guo, J. Li, A. Possemato, M.E. Sowa, R. Rad, J. Rush, M.J. Comb, J.W. Harper, and S.P. Gygi. 2011. Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Molecular cell*. 44:325-340.
- Knofler, M. 2010. Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. *Int J Dev Biol*. 54:269-280.
- Kodani, A., and C. Sutterlin. 2008. The Golgi protein GM130 regulates centrosome morphology and function. *Molecular biology of the cell*. 19:745-753.
- Kostek, M.C., Y.W. Chen, D.J. Cuthbertson, R. Shi, M.J. Fedele, K.A. Esser, and M.J. Rennie. 2007. Gene expression responses over 24 h to lengthening and shortening contractions in human muscle: major changes in CSRP3, MUSTN1, SIX1, and FBXO32. *Physiological genomics*. 31:42-52.
- Kotini, M., E.H. Barriga, J. Leslie, M. Gentzel, V. Rauschenberger, A. Schambony, and R. Mayor. 2018. Gap junction protein Connexin-43 is a direct transcriptional regulator of N-cadherin in vivo. *Nature communications*. 9:3846.
- Kottke, M.D., E. Delva, and A.P. Kowalczyk. 2006. The desmosome: cell science lessons from human diseases. *Journal of cell science*. 119:797-806.
- Kshitiz, J. Afzal, J.D. Maziarz, A. Hamidzadeh, C. Liang, E.M. Erkenbrack, H.N. Kim, J.D. Haeger, C. Pfarrer, T. Hoang, T. Ott, T. Spencer, M. Pavlicev, D.F. Antczak, A. Levchenko, and G.P. Wagner. 2019. Evolution of placental invasion and cancer metastasis are causally linked. *Nature ecology & evolution*. 3:1743-1753.
- Kulkarni-Gosavi, P., C. Makhoul, and P.A. Gleeson. 2019. Form and function of the Golgi apparatus: scaffolds, cytoskeleton and signalling. *FEBS letters*. 593:2289-2305.
- Kupfer, A., D. Louvard, and S.J. Singer. 1982. Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center in cultured fibroblasts at the edge of an experimental wound. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 79:2603-2607.
- Kwok, W.K., M.T. Ling, T.W. Lee, T.C. Lau, C. Zhou, X. Zhang, C.W. Chua, K.W. Chan, F.L. Chan, C. Glackin, Y.C. Wong, and X. Wang. 2005. Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target. *Cancer research*. 65:5153-5162.
- Laird, D.W. 2006. Life cycle of connexins in health and disease. *The Biochemical journal*. 394:527-543.
- Laird, D.W. 2008. Closing the gap on autosomal dominant connexin-26 and connexin-43 mutants linked to human disease. *The Journal of biological chemistry*. 283:2997-3001.
- Laird, D.W. 2010. The gap junction proteome and its relationship to disease. *Trends in cell biology*. 20:92-101.
- Laird, D.W., P. Fistouris, G. Batist, L. Alpert, H.T. Huynh, G.D. Carystinos, and M.A. Alaoui-Jamali. 1999. Deficiency of connexin43 gap junctions is an independent marker for breast tumors. *Cancer research*. 59:4104-4110.
- Lee, M.P., and K.E. Yutzey. 2011. Twist1 directly regulates genes that promote cell proliferation and migration in developing heart valves. *PLoS one*. 6:e29758.
- Leithe, E., M. Mesnil, and T. Aasen. 2018. The connexin 43 C-terminus: A tail of many tales. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*. 1860:48-64.
- Leman, E.S., A. Magheli, K.M. Yong, G. Netto, S. Hinz, and R.H. Getzenberg. 2009. Identification of nuclear structural protein alterations associated with seminomas. *Journal of cellular biochemistry*. 108:1274-1279.
- Li, W.E., K. Waldo, K.L. Linask, T. Chen, A. Wessels, M.S. Parmacek, M.L. Kirby, and C.W. Lo. 2002. An essential role for connexin43 gap junctions in mouse coronary artery development. *Development*. 129:2031-2042.
- Li, Z., Z. Zhou, and H.J. Donahue. 2008. Alterations in Cx43 and OB-cadherin affect breast cancer cell metastatic potential. *Clinical & experimental metastasis*. 25:265-272.
- Liu, H., Z. Li, Y. Cao, Y. Cui, X. Yang, Z. Meng, and R. Wang. 2019. Effect of chondrocyte mitochondrial dysfunction on cartilage degeneration: A possible pathway for

- osteoarthritis pathology at the subcellular level. *Molecular medicine reports*. 20:3308-3316.
- Liu, X., W. Liu, L. Yang, B. Xia, J. Li, J. Zuo, and X. Li. 2007. Increased connexin 43 expression improves the migratory and proliferative ability of H9c2 cells by Wnt-3a overexpression. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 39:391-398.
- Livak, K.J., and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods*. 25:402-408.
- Lu, X., Y. He, C. Zhu, H. Wang, S. Chen, and H.Y. Lin. 2016. Twist1 is involved in trophoblast syncytialization by regulating GCM1. *Placenta*. 39:45-54.
- Mabalirajan, U., A.K. Dinda, S. Kumar, R. Roshan, P. Gupta, S.K. Sharma, and B. Ghosh. 2008. Mitochondrial structural changes and dysfunction are associated with experimental allergic asthma. *Journal of immunology*. 181:3540-3548.
- MacLaren, R., W. Cui, S. Simard, and K. Cianflone. 2008. Influence of obesity and insulin sensitivity on insulin signaling genes in human omental and subcutaneous adipose tissue. *Journal of lipid research*. 49:308-323.
- Magi, A., L. Tattini, I. Cifola, R. D'Aurizio, M. Benelli, E. Mangano, C. Battaglia, E. Bonora, A. Kurg, M. Seri, P. Magini, B. Giusti, G. Romeo, T. Pippucci, G. De Bellis, R. Abbate, and G.F. Gensini. 2013. EXCAVATOR: detecting copy number variants from whole-exome sequencing data. *Genome biology*. 14:R120.
- Maneiro, E., M.A. Martin, M.C. de Andres, M.J. Lopez-Armada, J.L. Fernandez-Sueiro, P. del Hoyo, F. Galdo, J. Arenas, and F.J. Blanco. 2003. Mitochondrial respiratory activity is altered in osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis and rheumatism*. 48:700-708.
- Mani, M., D.T. Thao, B.C. Kim, U.H. Lee, D.J. Kim, S.H. Jang, S.H. Back, B.J. Lee, W.J. Cho, I.S. Han, and J.W. Park. 2019. DRG2 knockdown induces Golgi fragmentation via GSK3beta phosphorylation and microtubule stabilization. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*. 1866:1463-1474.
- Martinez, A.D., R. Acuna, V. Figueroa, J. Maripillan, and B. Nicholson. 2009. Gap-junction channels dysfunction in deafness and hearing loss. *Antioxidants & redox signaling*. 11:309-322.
- Matsuo, N., H. Shiraha, T. Fujikawa, N. Takaoka, N. Ueda, S. Tanaka, S. Nishina, Y. Nakanishi, M. Uemura, A. Takaki, S. Nakamura, Y. Kobayashi, K. Nouse, T. Yagi, and K. Yamamoto. 2009. Twist expression promotes migration and invasion in hepatocellular carcinoma. *BMC cancer*. 9:240.
- Matsuuchi, L., and C.C. Naus. 2013. Gap junction proteins on the move: connexins, the cytoskeleton and migration. *Biochimica et biophysica acta*. 1828:94-108.
- Mayan, M.D., P. Carpintero-Fernandez, R. Gago-Fuentes, O. Martinez-de-Ilarduya, H.Z. Wang, V. Valiunas, P. Brink, and F.J. Blanco. 2013. Human articular chondrocytes express multiple gap junction proteins: differential expression of connexins in normal and osteoarthritic cartilage. *The American journal of pathology*. 182:1337-1346.
- McLachlan, E., Q. Shao, and D.W. Laird. 2007. Connexins and gap junctions in mammary gland development and breast cancer progression. *The Journal of membrane biology*. 218:107-121.
- Mellor, H. 2004. Cell motility: Golgi signalling shapes up to ship out. *Current biology : CB*. 14:R434-435.
- Mendoza-Naranjo, A., P. Cormie, A.E. Serrano, C.M. Wang, C. Thrasivoulou, J.E. Sutcliffe, D.J. Gilmartin, J. Tsui, T.E. Serena, A.R. Phillips, and D.L. Becker. 2012. Overexpression of the gap junction protein Cx43 as found in diabetic foot ulcers can retard fibroblast migration. *Cell biology international*. 36:661-667.
- Mercier, F., and G.I. Hatton. 2001. Connexin 26 and basic fibroblast growth factor are expressed primarily in the subpial and subependymal layers in adult brain

- parenchyma: roles in stem cell proliferation and morphological plasticity? *The Journal of comparative neurology*. 431:88-104.
- Millarte, V., and H. Farhan. 2012. The Golgi in cell migration: regulation by signal transduction and its implications for cancer cell metastasis. *ScientificWorldJournal*. 2012:498278.
- Minton, D.R., M. Nam, D.J. McLaughlin, J. Shin, E.C. Bayraktar, S.W. Alvarez, V.O. Sviderskiy, T. Papagiannakopoulos, D.M. Sabatini, K. Birsoy, and R. Possemato. 2018. Serine Catabolism by SHMT2 Is Required for Proper Mitochondrial Translation Initiation and Maintenance of Formylmethionyl-tRNAs. *Molecular cell*. 69:610-621 e615.
- Miro-Casas, E., M. Ruiz-Meana, E. Agullo, S. Stahlhofen, A. Rodriguez-Sinovas, A. Cabestrero, I. Jorge, I. Torre, J. Vazquez, K. Boengler, R. Schulz, G. Heusch, and D. Garcia-Dorado. 2009. Connexin43 in cardiomyocyte mitochondria contributes to mitochondrial potassium uptake. *Cardiovascular research*. 83:747-756.
- Mladinov, M., G. Sedmak, H.R. Fuller, M. Babic Leko, D. Mayer, J. Kirincich, A. Stajduhar, F. Borovecki, P.R. Hof, and G. Simic. 2016. Gene expression profiling of the dorsolateral and medial orbitofrontal cortex in schizophrenia. *Translational neuroscience*. 7:139-150.
- Moorby, C., and M. Patel. 2001. Dual functions for connexins: Cx43 regulates growth independently of gap junction formation. *Experimental cell research*. 271:238-248.
- Mori, R., K.T. Power, C.M. Wang, P. Martin, and D.L. Becker. 2006. Acute downregulation of connexin43 at wound sites leads to a reduced inflammatory response, enhanced keratinocyte proliferation and wound fibroblast migration. *Journal of cell science*. 119:5193-5203.
- Mygind, K.J., J. Schwarz, P. Sahgal, J. Ivaska, and M. Kveiborg. 2018. Loss of ADAM9 expression impairs beta1 integrin endocytosis, focal adhesion formation and cancer cell migration. *Journal of cell science*. 131.
- Nair, R.R., M. Jain, and K. Singh. 2011. Reduced expression of gap junction gene connexin 43 in recurrent early pregnancy loss patients. *Placenta*. 32:619-621.
- Nakagomi, S., M.J. Barsoum, E. Bossy-Wetzel, C. Sutterlin, V. Malhotra, and S.A. Lipton. 2008. A Golgi fragmentation pathway in neurodegeneration. *Neurobiology of disease*. 29:221-231.
- Narayanan, M., J.L. Huynh, K. Wang, X. Yang, S. Yoo, J. McElwee, B. Zhang, C. Zhang, J.R. Lamb, T. Xie, C. Suver, C. Molony, S. Melquist, A.D. Johnson, G. Fan, D.J. Stone, E.E. Schadt, P. Casaccia, V. Emilsson, and J. Zhu. 2014. Common dysregulation network in the human prefrontal cortex underlies two neurodegenerative diseases. *Molecular systems biology*. 10:743.
- Naus, C.C., and D.W. Laird. 2010. Implications and challenges of connexin connections to cancer. *Nature reviews. Cancer*. 10:435-441.
- Ng, Y.H., H. Zhu, and P.C. Leung. 2012. Twist modulates human trophoblastic cell invasion via regulation of N-cadherin. *Endocrinology*. 153:925-936.
- Niaz, S., and M.U. Hussain. 2018. Role of GW182 protein in the cell. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 101:29-38.
- Olk, S., A. Turchinovich, M. Grzendowski, K. Stuhler, H.E. Meyer, G. Zoidl, and R. Dermietzel. 2010. Proteomic analysis of astroglial connexin43 silencing uncovers a cytoskeletal platform involved in process formation and migration. *Glia*. 58:494-505.
- Oyamada, M., K. Takebe, and Y. Oyamada. 2013. Regulation of connexin expression by transcription factors and epigenetic mechanisms. *Biochimica et biophysica acta*. 1828:118-133.
- Paczkowska, E., K. Luczkowska, K. Piecyk, D. Roginska, E. Pius-Sadowska, P. Ustianowski, E. Cecerska, B. Dolegowska, Z. Celewicz, and B. Machalinski. 2015. The influence of BDNF on human umbilical cord blood stem/progenitor cells: implications for stem cell-based

- therapy of neurodegenerative disorders. *Acta neurobiologiae experimentalis*. 75:172-191.
- Park, C.C., G.D. Gale, S. de Jong, A. Ghazalpour, B.J. Bennett, C.R. Farber, P. Langfelder, A. Lin, A.H. Khan, E. Eskin, S. Horvath, A.J. Lusis, R.A. Ophoff, and D.J. Smith. 2011. Gene networks associated with conditional fear in mice identified using a systems genetics approach. *BMC systems biology*. 5:43.
- Paznekas, W.A., B. Karczeski, S. Vermeer, R.B. Lowry, M. Delatycki, F. Laurence, P.A. Koivisto, L. Van Maldergem, S.A. Boyadjiev, J.N. Bodurtha, and E.W. Jabs. 2009. GJA1 mutations, variants, and connexin 43 dysfunction as it relates to the oculodentodigital dysplasia phenotype. *Human mutation*. 30:724-733.
- Polyak, K., and M. Hu. 2005. Do myoepithelial cells hold the key for breast tumor progression? *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 10:231-247.
- Prigozhina, N.L., and C.M. Waterman-Storer. 2004. Protein kinase D-mediated anterograde membrane trafficking is required for fibroblast motility. *Current biology : CB*. 14:88-98.
- Qian, J., Y. Luo, X. Gu, W. Zhan, and X. Wang. 2013. Twist1 promotes gastric cancer cell proliferation through up-regulation of FoxM1. *PloS one*. 8:e77625.
- Rabouille, C., and V. Kondylis. 2007. Golgi ribbon unlinking: an organelle-based G2/M checkpoint. *Cell cycle*. 6:2723-2729.
- Raftopoulou, M., and A. Hall. 2004. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Developmental biology*. 265:23-32.
- Raman, R., C.S. Pinto, and M. Sonawane. 2018. Polarized Organization of the Cytoskeleton: Regulation by Cell Polarity Proteins. *Journal of molecular biology*. 430:3565-3584.
- Reaume, A.G., P.A. de Sousa, S. Kulkarni, B.L. Langille, D. Zhu, T.C. Davies, S.C. Juneja, G.M. Kidder, and J. Rossant. 1995. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science*. 267:1831-1834.
- Rena, V., J. Flores-Martin, S. Angeletti, G.M. Panzetta-Dutari, and S. Genti-Raimondi. 2011. StarD7 gene expression in trophoblast cells: contribution of SF-1 and Wnt-beta-catenin signaling. *Molecular endocrinology*. 25:1364-1375.
- Rhee, D.Y., X.Q. Zhao, R.J. Francis, G.Y. Huang, J.D. Mably, and C.W. Lo. 2009. Connexin 43 regulates epicardial cell polarity and migration in coronary vascular development. *Development*. 136:3185-3193.
- Ribeiro-Rodrigues, T.M., T. Martins-Marques, S. Morel, B.R. Kwak, and H. Girao. 2017. Role of connexin 43 in different forms of intercellular communication - gap junctions, extracellular vesicles and tunnelling nanotubes. *Journal of cell science*. 130:3619-3630.
- Richard, G. 2005. Connexin disorders of the skin. *Clinics in dermatology*. 23:23-32.
- Ridley, A.J., M.A. Schwartz, K. Burridge, R.A. Firtel, M.H. Ginsberg, G. Borisy, J.T. Parsons, and A.R. Horwitz. 2003. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. 302:1704-1709.
- Rinaldi, F., E.M. Hartfield, L.A. Crompton, J.L. Badger, C.P. Glover, C.M. Kelly, A.E. Rosser, J.B. Uney, and M.A. Caldwell. 2014. Cross-regulation of Connexin43 and beta-catenin influences differentiation of human neural progenitor cells. *Cell death & disease*. 5:e1017.
- Rios, R.M. 2014. The centrosome-Golgi apparatus nexus. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 369.
- Roderick, S.L., W.W. Chan, D.S. Agate, L.R. Olsen, M.W. Vetting, K.R. Rajashankar, and D.E. Cohen. 2002. Structure of human phosphatidylcholine transfer protein in complex with its ligand. *Nature structural biology*. 9:507-511.
- Rodriguez, M., S.S. Li, J.W. Harper, and Z. Songyang. 2004. An oriented peptide array library (OPAL) strategy to study protein-protein interactions. *The Journal of biological chemistry*. 279:8802-8807.

-
- Rome, S., K. Clement, R. Rabasa-Lhoret, E. Loizon, C. Poitou, G.S. Barsh, J.P. Riou, M. Laville, and H. Vidal. 2003. Microarray profiling of human skeletal muscle reveals that insulin regulates approximately 800 genes during a hyperinsulinemic clamp. *The Journal of biological chemistry*. 278:18063-18068.
- Rout, U.K. 2006. Valproate, thalidomide and ethyl alcohol alter the migration of HTR-8/SVneo cells. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 4:44.
- Saita, S., T. Tatsuta, P.A. Lampe, T. Konig, Y. Ohba, and T. Langer. 2018. PARL partitions the lipid transfer protein STARD7 between the cytosol and mitochondria. *The EMBO journal*. 37.
- Salat-Canela, C., M. Sese, C. Peula, S. Ramon y Cajal, and T. Aasen. 2014. Internal translation of the connexin 43 transcript. *Cell communication and signaling : CCS*. 12:31.
- Sandell, L.J., and T. Aigner. 2001. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis research*. 3:107-113.
- Schwartz, M.A., and A.R. Horwitz. 2006. Integrating adhesion, protrusion, and contraction during cell migration. *Cell*. 125:1223-1225.
- Selman, M., A. Pardo, L. Barrera, A. Estrada, S.R. Watson, K. Wilson, N. Aziz, N. Kaminski, and A. Zlotnik. 2006. Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 173:188-198.
- Severs, N.J., A.F. Bruce, E. Dupont, and S. Rothery. 2008. Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovascular research*. 80:9-19.
- Silva, J.F., and R. Serakides. 2016. Intrauterine trophoblast migration: A comparative view of humans and rodents. *Cell adhesion & migration*. 10:88-110.
- Sirnes, S., J. Bruun, M. Kolberg, A. Kjenseth, G.E. Lind, A. Svindland, A. Brech, A. Nesbakken, R.A. Lothe, E. Leithe, and E. Rivedal. 2012. Connexin43 acts as a colorectal cancer tumor suppressor and predicts disease outcome. *International journal of cancer*. 131:570-581.
- Smyth, J.W., and R.M. Shaw. 2013. Autoregulation of connexin43 gap junction formation by internally translated isoforms. *Cell reports*. 5:611-618.
- Sokolovic, M., A. Sokolovic, C.P. van Roomen, A. Gruber, R. Ottenhoff, S. Scheij, T.B. Hakvoort, W.H. Lamers, and A.K. Groen. 2010. Unexpected effects of fasting on murine lipid homeostasis--transcriptomic and lipid profiling. *Journal of hepatology*. 52:737-744.
- Solan, J.L., and P.D. Lampe. 2009. Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects. *The Biochemical journal*. 419:261-272.
- Sorgen, P.L., A.J. Trease, G. Spagnol, M. Delmar, and M.S. Nielsen. 2018. Protein(-)Protein Interactions with Connexin 43: Regulation and Function. *International journal of molecular sciences*. 19.
- Spagnol, G., A.J. Trease, L. Zheng, M. Gutierrez, I. Basu, C. Sarmiento, G. Moore, M. Cervantes, and P.L. Sorgen. 2018. Connexin43 Carboxyl-Terminal Domain Directly Interacts with beta-Catenin. *International journal of molecular sciences*. 19.
- Spinazzi, M., E. Radaelli, K. Horre, A.M. Arranz, N.V. Gounko, P. Agostinis, T.M. Maia, F. Impens, V.A. Morais, G. Lopez-Lluch, L. Serneels, P. Navas, and B. De Strooper. 2019. PARL deficiency in mouse causes Complex III defects, coenzyme Q depletion, and Leigh-like syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 116:277-286.
- Sutterlin, C., and A. Colanzi. 2010. The Golgi and the centrosome: building a functional partnership. *The Journal of cell biology*. 188:621-628.
- Svitkina, T. 2018. The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 10.
- Takagi, J., H.P. Erickson, and T.A. Springer. 2001. C-terminal opening mimics 'inside-out' activation of integrin alpha5beta1. *Nature structural biology*. 8:412-416.
-

-
- Thorsell, A.G., W.H. Lee, C. Persson, M.I. Siponen, M. Nilsson, R.D. Busam, T. Kotenyova, H. Schuler, and L. Lehtio. 2011. Comparative structural analysis of lipid binding START domains. *PLoS one*. 6:e19521.
- Tweedie, D., L. Rachmany, D.S. Kim, V. Rubovitch, E. Lehrmann, Y. Zhang, K.G. Becker, E. Perez, C.G. Pick, and N.H. Greig. 2016. Mild traumatic brain injury-induced hippocampal gene expressions: The identification of target cellular processes for drug development. *Journal of neuroscience methods*. 272:4-18.
- Valderrama, F., J.M. Duran, T. Babia, H. Barth, J. Renau-Piqueras, and G. Egea. 2001. Actin microfilaments facilitate the retrograde transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum in mammalian cells. *Traffic*. 2:717-726.
- Varela-Eirin, M., A. Varela-Vazquez, A. Guitian-Caamano, C.L. Paino, V. Mato, R. Largo, T. Aasen, A. Tabertero, E. Fonseca, M. Kandouz, J.R. Caeiro, A. Blanco, and M.D. Mayan. 2018. Targeting of chondrocyte plasticity via connexin43 modulation attenuates cellular senescence and fosters a pro-regenerative environment in osteoarthritis. *Cell death & disease*. 9:1166.
- Varela-Eirin, M., A. Varela-Vazquez, M. Rodriguez-Candela Mateos, A. Vila-Sanjurjo, E. Fonseca, J.L. Mascarenas, M. Eugenio Vazquez, and M.D. Mayan. 2017. Recruitment of RNA molecules by connexin RNA-binding motifs: Implication in RNA and DNA transport through microvesicles and exosomes. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*. 1864:728-736.
- Varela-Eirin, M., P. Carpintero-Fernandez, A. Sanchez-Temprano, A. Varela-Vazquez, C.L. Paino, A. Casado-Diaz, A.C. Continente, V. Mato, E. Fonseca, M. Kandouz, A. Blanco, J.R. Caeiro, and M.D. Mayan. 2020. Senolytic activity of small molecular polyphenols from olive restores chondrocyte redifferentiation and promotes a pro-regenerative environment in osteoarthritis. *Aging*. 12:15882-15905.
- Vinken, M., E. Decrock, L. Leybaert, G. Bultynck, B. Himpens, T. Vanhaecke, and V. Rogiers. 2012. Non-channel functions of connexins in cell growth and cell death. *Biochimica et biophysica acta*. 1818:2002-2008.
- Vreeburg, M., E.A. de Zwart-Storm, M.I. Schouten, R.G. Nellen, D. Marcus-Soekarman, M. Davies, M. van Geel, and M.A. van Steensel. 2007. Skin changes in oculo-dento-digital dysplasia are correlated with C-terminal truncations of connexin 43. *American journal of medical genetics. Part A*. 143:360-363.
- Wada, K., J.T. Howard, P. McConnell, O. Whitney, T. Lints, M.V. Rivas, H. Horita, M.A. Patterson, S.A. White, C. Scharff, S. Haesler, S. Zhao, H. Sakaguchi, M. Hagiwara, T. Shiraki, T. Hirozane-Kishikawa, P. Skene, Y. Hayashizaki, P. Carninci, and E.D. Jarvis. 2006. A molecular neuroethological approach for identifying and characterizing a cascade of behaviorally regulated genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:15212-15217.
- Wang, Z.H., Z. Li, M. Hu, Q.J. Yang, S. Yan, R.S. Wu, B.A. Li, and M. Guo. 2017. Ovol2 gene inhibits the Epithelial-to-Mesenchymal Transition in lung adenocarcinoma by transcriptionally repressing Twist1. *Gene*. 600:1-8.
- Wiese, A.H., J. Auer, S. Lassmann, J. Nahrig, R. Rosenberg, H. Hofler, R. Ruger, and M. Werner. 2007. Identification of gene signatures for invasive colorectal tumor cells. *Cancer detection and prevention*. 31:282-295.
- Winterhager, E., and G.M. Kidder. 2015. Gap junction connexins in female reproductive organs: implications for women's reproductive health. *Human reproduction update*. 21:340-352.
- Wong, L.H., A.T. Gatta, and T.P. Levine. 2019. Lipid transfer proteins: the lipid commute via shuttles, bridges and tubes. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 20:85-101.
-

- Wright, H.J., J.B. Matthews, I.L. Chapple, N. Ling-Mountford, and P.R. Cooper. 2008. Periodontitis associates with a type 1 IFN signature in peripheral blood neutrophils. *Journal of immunology*. 181:5775-5784.
- Wu, J.I., and L.H. Wang. 2019. Emerging roles of gap junction proteins connexins in cancer metastasis, chemoresistance and clinical application. *Journal of biomedical science*. 26:8.
- Xi, Y., G. Nakajima, J.C. Schmitz, E. Chu, and J. Ju. 2006. Multi-level gene expression profiles affected by thymidylate synthase and 5-fluorouracil in colon cancer. *BMC genomics*. 7:68.
- Xu, K., M. Ji, X. Huang, Y. Peng, W. Wu, and J. Zhang. 2020. Differential Regulatory Roles of MicroRNAs in Porcine Intramuscular and Subcutaneous Adipocytes. *Journal of agricultural and food chemistry*. 68:3954-3962.
- Xu, X., R. Francis, C.J. Wei, K.L. Linask, and C.W. Lo. 2006. Connexin 43-mediated modulation of polarized cell movement and the directional migration of cardiac neural crest cells. *Development*. 133:3629-3639.
- Yadav, S., S. Puri, and A.D. Linstedt. 2009. A primary role for Golgi positioning in directed secretion, cell polarity, and wound healing. *Molecular biology of the cell*. 20:1728-1736.
- Yadav, S., M.A. Puthenveedu, and A.D. Linstedt. 2012. Golgin160 recruits the dynein motor to position the Golgi apparatus. *Developmental cell*. 23:153-165.
- Yamamoto, H., S. Kakuta, T.M. Watanabe, A. Kitamura, T. Sekito, C. Kondo-Kakuta, R. Ichikawa, M. Kinjo, and Y. Ohsumi. 2012. Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *The Journal of cell biology*. 198:219-233.
- Yang, B., H. Lin, J. Xiao, Y. Lu, X. Luo, B. Li, Y. Zhang, C. Xu, Y. Bai, H. Wang, G. Chen, and Z. Wang. 2007. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nature medicine*. 13:486-491.
- Yang, L., I. Lewkowich, K. Apsley, J.M. Fritz, M. Wills-Karp, and T.E. Weaver. 2015. Haploinsufficiency for Stard7 is associated with enhanced allergic responses in lung and skin. *Journal of immunology*. 194:5635-5643.
- Yang, L., C.L. Na, S. Luo, D. Wu, S. Hogan, T. Huang, and T.E. Weaver. 2017. The Phosphatidylcholine Transfer Protein Stard7 is Required for Mitochondrial and Epithelial Cell Homeostasis. *Scientific reports*. 7:46416.
- Yang, Y., J.C. Todt, D.M. Svinarich, F. Qureshi, S.M. Jacques, C.H. Graham, A.E. Chung, B. Gonik, and F.D. Yelian. 1996. Human trophoblast cell adhesion to extracellular matrix protein, entactin. *American journal of reproductive immunology*. 36:25-32.
- Yung, C.K., V.L. Halperin, G.F. Tomaselli, and R.L. Winslow. 2004. Gene expression profiles in end-stage human idiopathic dilated cardiomyopathy: altered expression of apoptotic and cytoskeletal genes. *Genomics*. 83:281-297.
- Zhang, X.F., and X. Cui. 2017. Connexin 43: Key roles in the skin. *Biomedical reports*. 6:605-611.
- Zhao, Z., M.A. Rahman, Z.G. Chen, and D.M. Shin. 2017. Multiple biological functions of Twist1 in various cancers. *Oncotarget*. 8:20380-20393.
- Zhu, R., C. Liu, and G.G. Gundersen. 2018. Nuclear positioning in migrating fibroblasts. *Seminars in cell & developmental biology*. 82:41-50.
- Zhu, X.M., T. Han, I.L. Sargent, G.W. Yin, and Y.Q. Yao. 2009. Differential expression profile of microRNAs in human placentas from preeclamptic pregnancies vs normal pregnancies. *American journal of obstetrics and gynecology*. 200:661 e661-667.
- Zilberman, Y., N.O. Alieva, S. Miserey-Lenkei, A. Lichtenstein, Z. Kam, H. Sabanay, and A. Bershadsky. 2011. Involvement of the Rho-mDia1 pathway in the regulation of Golgi complex architecture and dynamics. *Molecular biology of the cell*. 22:2900-2911.